الهندسة الوراثية والوراثة الميكروبية

(الجزء الثاني)

تأليف

أ.د. عماد الدين حسين وصفى

أستاذ ورئيس قسم النبات الزراعى وأمراض النبات

كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية

حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التشجيعية عام ١٩٧٧

حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التقديرية عام ٢٠٠٥



الدار العربية للنشر والتوزيع

الهندسة الوراثية
والوراثة الميكروبية

الهندسة الوراثية والوراثة الميكروبية

الجزء الثاني

تأليف

أ. د. عماد الدين حسين وصفى

أستاذ ورئيس قسم النبات الزراعى وأمراض النبات

كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية

حائز على جائزة جامعة الأسكندرية التشجعية عام ١٩٧٧

حائز على جائزة جامعة الأسكندرية التقديرية عام ٢٠٠٥

الطبعة الأولى

٢٠٠٧

حقوق النشر

الهندســـة الوراثيـــة
والوراثـــة الميكروبيـــة

رقم الإيداع : ٢٠٠٧/١٥٦٦٢
I. S. B. N. : 977-258-292-9

٣٢ شارع عبـــاس العقاد - مدينة نصر
ت : ٢٧٥٣٣٣٥ فاكس : ٢٧٥٣٣٨٨

مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربية فى بلادنا يومًا بعد يوم. ولاشك أنه فى الغد القريب ستستعيد اللغة العربية هيبتها التى طالما امتهنت وأذلت من أبنائها وغير أبنائها. ولا ريب فى أن امتهان لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقافى فكرى للأمة نفسها؛ الأمر الذى يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالاً ونساءً، طلابًا وطالبات، علماء ومثقفين، مفكرين وسياسيين فى سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التى اعترف المجتمع الدولى بها لغة عمل فى منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها فى أنحاء العالم، لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت - فيما مضى - علوم الأمم الأخرى، وصهرتها فى بوتقتها اللغوية والفكرية، فكانت لغة العلوم والأدب، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة.

إن الفضل فى التقدم العلمى الذى تنعم به أوروبا اليوم يرجع فى واقعه إلى الصحوة العلمية فى الترجمة التى عاشتها فى القرون الوسطى. فقد كان المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن اللغة العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابى وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب، ولم ينكر الأوروبيون ذلك، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة والعرب والإغريق، وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطواعة للعلم والتدريس والتأليف، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم، وأن غيرها ليس بأدق منها، ولا أقدر على التعبير.

ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع عصر الاستعمار التركى، ثم البريطانى والفرنسى، عاق اللغة عن النمو والتطور، وأبعدها عن العلم والحضارة، ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لابد من أن تتغير، وأن جمودهم لابد أن تدب فيه الحياة، اندفع الرواد من اللغويين والأدباء، والعلماء فى إنماء اللغة وتطويرها، حتى أن مدرسة قصر العينى فى القاهرة، والجامعة الأمريكية فى بيروت درستا الطب بالعربية أول إنشائها. ولو تصفحنا الكتب التى ألفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيهما باللغة العربية لوجدناها كتبًا ممتازة لا تقل جودة عن أمثلتها من كتب الغرب فى ذلك الحين، سواء فى الطبع، أو حسن التعبير، أو براعة الإيضاح، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد، وسادت لغة المستعمر. وفرضت على أبناء الأمة فرضًا، إذ رأى المستعمر فى خنق اللغة العربية مجالاً لعرقلة الأمة العربية.

وبالرغم من المقاومة العنيفة التى قابلها، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجنبى فيما يتطلع إليه، فتفننوا فى أساليب التملق له اكتسابًا لمرضاته، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة، يشككون فى قدرة اللغة على استيعاب الحضارة الجديدة، وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسى لجيشه الزاحف إلى الجزائر: "علموا لغتنا وانشروها حتى نحكم الجزائر، فإذا حكمت لغتنا الجزائر، فقد حكمناها حقيقة".

فهل لى أن أوجه نداءً إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر – فى أسرع وقت ممكن – إلى اتخاذ التدابير، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام، والمهنى، والجامعى، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الإطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم. وكلنا ثقة من إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب، نظرًا لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى، وبذلك تزداد حصيلته الدراسية، ويرتفع بمستواه العلمى، وذلك يعتبر تأصيلاً للفكر العلمى فى البلاد، وتمكينًا للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن حاجات المجتمع، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم.

ولا يغيب عن حكومتنا العربية أن حركة التعريب تسير متابطئة، أو تكاد تتوقف، بل تحارب أحيانًا ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات، ممن ترك الإستعمار فى نفوسهم عقدًا وأمراضًا، رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم إلى اللغة العبرية، وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد عن خمسة عشر مليون يهوديًا، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول واطلاعى وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآدب والتقنية، كاليابان، وإسبانيا، وألمانيا، ودول أمريكا اللاتينية، ولم تشك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة، فهل أمة العرب أقل شأنًا من غيرها ؟!.

وأخيرًا .. وتمشيًا مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع، وتحقيقًا لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقه إلى رحاب لغتنا الشريفة، تقوم الدار بنشر هذا الكتاب المتميز الذى يعتبر واحدًا من ضمن ما نشرته – وستقوم بنشره – الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها أو ترجمتها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة.

وبهذا .. ننفذ عهدًا قطعناه على المضى قدما فيما أردناه من خدمة لغة الوحى، وفيما أرداه الله تعالى لنا من جهاد فيها.

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابه الكريم: ﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَى عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُم بِمَا كُنتُمْ تَعْمَلُونَ ﴾.

محمد أحمد دربالة

الدار العربية للنشر والتوزيع

بسم الله الرحمن الرحيم

إهــــداء

من أســــرتي:

والدتي ووالدي وبناتي المهندستان مروه ومي وزوجتي

من أساتذتي:

إلى أستاذي المرحوم الأستاذ الدكتور
عباس فتحي الهلالي
رائــــد علم أمراض النبات في مصر
وقد علمني الكثير من علمه وخلقه

إلى أستاذي المرحوم الأستاذ الدكتور
صلاح الدين عيد
أحــد رواد ومؤسس علم النبات في مصر
وقد علمني أيضًا الكثير من علمه وخلقه

وأساتذتي الأفاضل أطال الله في عمرهم الأستاذ الدكتور مصطفي أبو الدهب: أحــد أعــلام أمــراض النبــات وأحــد مؤسســي علــم أمــراض النبــات البكتيرية والفطرية.

الأستاذ الدكتور حسين العروسي: أحــد أعــلام أمــراض النبــات وأحــد مؤسسي علم أمراض النبات الفطرية.

الأســتاذ الــدكتور وجــدي الســواح: أحــد أعــلام أمــراض النبــات وأحــد مؤسسي علم أمراض النبات الفطرية.

المقدمة

تعتبر الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية بمثابة الثورة العلمية الرابعة بعد الثورات العلمية المرتبطة بإستخدام البخار ثم الطاقة النووية فثورة المعلومات (ومنها علوم الكمبيوتر) ... وحيث أن العالم العربة بما فيه مصر لم يشترك بالبحث مع الدول المتطورة فى الثورات العلمية الثلاث الأولى فإنه لم يعد مسموحًا أن تفوته ثورة الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ... ذلك أن الدول التى ستمتلك ناصية الثورة الرابعة خلال القرن القادم ستمتلك العالم ... إذ أن الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ترتبط بشتى نواحى العلم سواء الزراعى أو الدوائى أو الطبى أو البيطرى أو الهندسى أو البيئى وبما يتحكم فى غذاء وكساء وعلاج الإنسان وغيره من المخلوقات .. يحتاج الإلمام بالهندسة الوراثية إلى خلفية جيدة من علوم كثيرة ومنها الكيمياء والكيمياء الحيوية والإنزيمات وعلوم الكائنات الحية الدقيقة ومنها بالذات البكتيريا والفطريات والفيرس وعلوم الوراثة والخلية والوراثة السيتولوجية وأيضًا علوم النبات وكثير من علوم الزراعة وأيضًا علوم الحيوان وأيضًا علوم الطب والصيدلة وخاصة فسيولوجى الإنسان ولذلك فإنه من الصعب تأليف مؤلف واحد فقط عن الهندسة الوراثية ولذلك فإن هذا الكتاب سيكون إن شاء الله أول مؤلف فى هذه السلسلة والتى ستصدر تباعًا. هذا الكتاب يضم كثير من أساسيات الهندسة الوراثية وسيتم إستكمال الكثير منها فى مؤلفات تالية إن شاء الله.

سيتم إستخدام إصطلاح توطين الجين Gene cloning بدلاً من الإستنساخ فى هذا الكتاب لأن هذه التسمية أفضل وأدق علميًا.

بعد إنتشار مؤلفاتى السابقة فى العالم العربى وحيث يصلنى عنها خطابات من جميع الدول العربية من الجزائر والمغرب غربًا إلى السعودية والعراق شرقًا واليمن والسودان جنوبًا فإننى أهدى هذا المؤلف إلى جميع قراء العالم العربى وهو شامل ومبسط وحديث.

هذا المؤلف شامل ومناسب لخريجى كليات الزراعة والعلوم والتربية والطب والطب البيطرى والهندسة الصحية والصيدلية وجميع المهتمين بالهندسة الوراثية فى جميع المجالات السابقة.

أدعو من الله العلى القدير أن يلهمنى الصواب ويوفقنى فى مؤلفات قادمة.

"إنما يخشى الله من عباده العلماء"

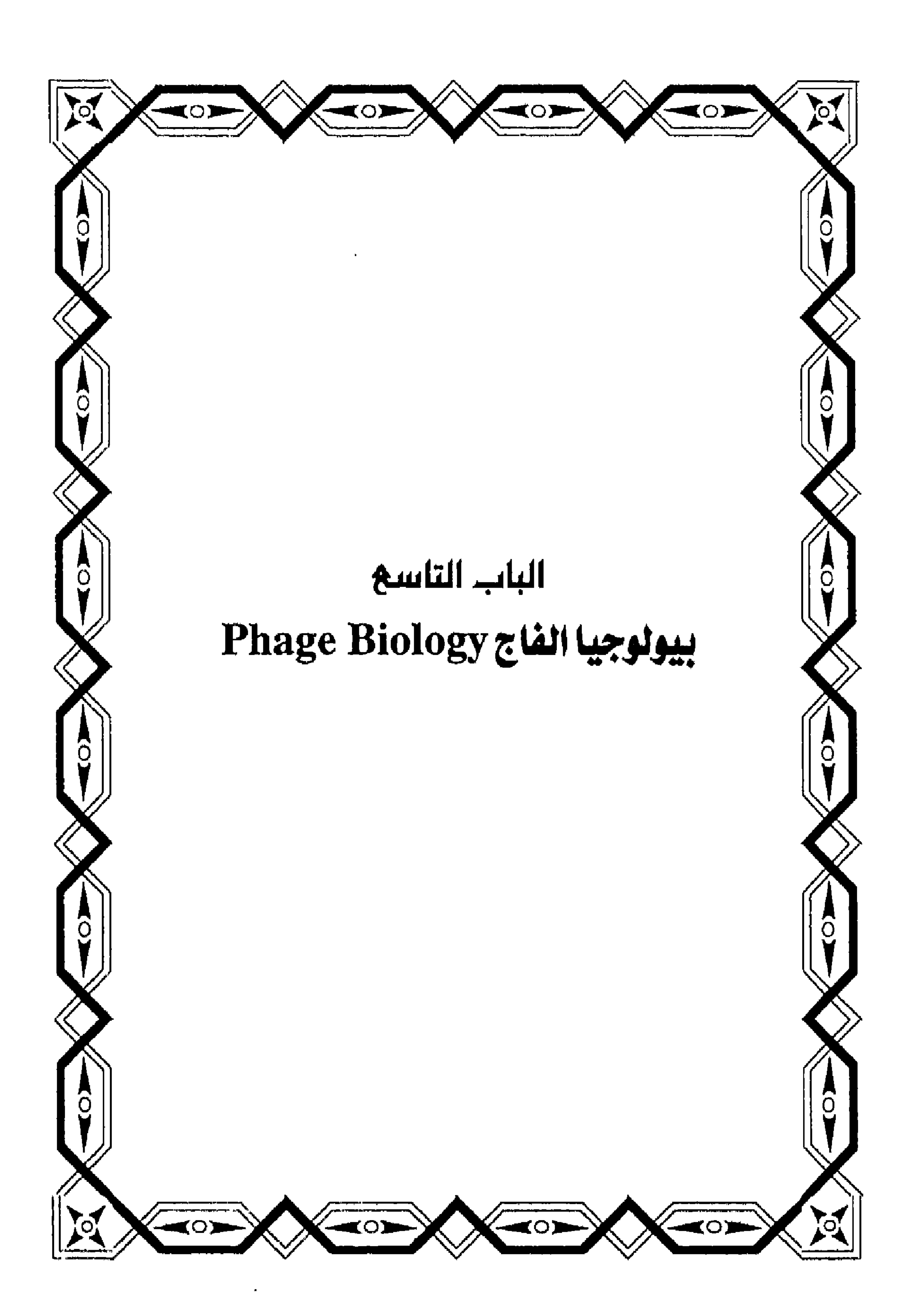
المؤلف

المحتويات

الموضوع — الصفحة

الجزء الأول

الجزء الثاني



الباب التاسع

بيولوجيا الفاج Phage Biology

الباب التاسع
بيولوجيا الفاج Phage Biology

يعتبر الفاج Phage أو البكتيريوفاج bacteriophage فيرس يعيش داخل الخلية البكتيرية. يلعب دور هام فى تقدم الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية. يعتبر قليل من الفاجات من أكثر الكائنات التى تمت معرفتها تماما وتم معرفة كل شئ عنها وذلك بالمقارنة بأى كائن آخر. وحيث أن الفاجات أقل تعقيدا من البكتيريا وأيضا أقل تعقيدا من خلايا الكائنات الراقية ولذلك فإنها تستعمل بكثرة فى دراسة دنا من حيث النسخ والتضاعف أو التكرار والتنظيم. وعندما يستعمل جمع الفاج أى الفاجات phages فإنها تشير إلى أنواع عديدة من الفاج أى أكثر من نوع ولكن عند إستعمال كلمة فاج phage فإنها تعنى نوع واحد من الفاج وتشمل جزيئ واحد من الفاج أو عديد من جزيئات هذا الفاج أى تشمل المفرد والجمع لنفس الفاج. أى أن كلمة فاج تشمل نوع واحد من الفاج للمفرد والجمع من هذا الفاج. ولذلك فإن PI، P22 نوعين من الفاج ولذلك يطلق عليهما فاجات (بالعربى فاجين) ولذلك فإنه يمكن أن تحتوى أنبوبة الإختبار على نوع واحد من الفاج PI أو P22.

الخواص العامة للفاجات
General Properties Of Phages

يعتبر الفاج طفيل على البكتريا وهو إجبارى التطفل. يمكن لجزيئ الفاج أن يبقى لفترة دون أن يتأثر ولكنه غير قادر على التكاثر إلا فى داخل خلية البكتريا. تحتوى كثير من الفاجات على جينات تخلق كثير من البروتينات. جميع الفاجات تستخدم الأحماض الأمينية وجهاز تخليق البروتين والطاقة اللازمة الخاصة بخلية البكتريا ولذلك فإن الفاج يتكاثر فقط داخل خلية البكتريا النشطة. كل جزئ فاج لابد أن يقوم ببعض الوظائف الضرورية له لكى يستمر فى الحياة وهى ما يأتى:

١ - حماية الأحماض النووية من المركبات الكيماوية الموجودة فى البيئة والتى تغير من تركيب الجزيئ. هذه الكيماويات قد تسبب كسر الجزيئ أو تسبب حدوث الطفرات.

٢ - توصيل الأحماض النووية الخاصة به إلى داخل خلية البكتريا.

٣ - تحويل خلية البكتيريا إلى جهاز لإنتاج الفاج أو مستودع لإنتاج الفاج وينتج عن ذلك أعداد كبيرة من الفاج داخل خلية البكتريا.

٤ - تحرر الأعداد الكبيرة من الفاج من خلية البكتريا.

يتم عمل الخطوات السابقة بطرق مختلفة تبعا لنوع الفاج. جميع الفاجات لها صفات عامة ولكنها تختلف فيما بينها فى تفاصيل الأداء لوظائفها المختلفة.

وأحد هذه الإختلافات هى درجة إستعمال الفاج لخلية البكتريا أى لآلية الخلية البكتيرية ومثال ذلك أن بعض الفاجات لها عدد قليل من الجينات أقل من عشرة جينات وتعتمد تماما على آلية خلية البكتريا بينما بعض الفاجات لها ٣٠ إلى مائة جين ولذلك فإنها تعتمد على البروتين المخلق تبعا لتأثير جيناتها. وقليل من الفاجات الكبيرة لها الكثير من الجينات الخاصة بها والتى تتحكم فى صفات معينة مثل تضاعف دنا ولذلك فإنها لا تحتاج إلى جينات الخلية البكتيرية لأداء هذه الوظائف. والأكثر من ذلك وفى حالات قليلة فإنه يمكن للفاجات مضاعفة جينات البكتريا.

تركيب الفاجات

Structure Of Phages

تختلف الفاجات فى تركيبها إلى حد ما ينعكس ذلك على دورة حياتها. يوجد ثلاثة أنواع رئيسية من الفاجات وهى (شكل ١):

١ - فاجات لها رأس وليس لها ذيل والرأس عديد الأضلع icosahedral.

٢ - فاجات لها رأس وذيل والرأس عديد الأضلع icosahedral.

٣ - فاجات خيطية filamentous.

يحتوى جزيئ الفاج عادة على جزيئ حامض نووى مفرد وقد يكون الجزيئ وحيد الخيط single stranded (ss) أو ثنائى الخيط double stranded (ds).

وقد يكون الجزيئ خيطى أى شريطى أو دائرى فى حالة دنا. أو يكون الجزيئ وحيد الخيط شريطى من رنا. كما يحتوى جزيئ الفاج على نوع واحد من البروتين أو أكثر.

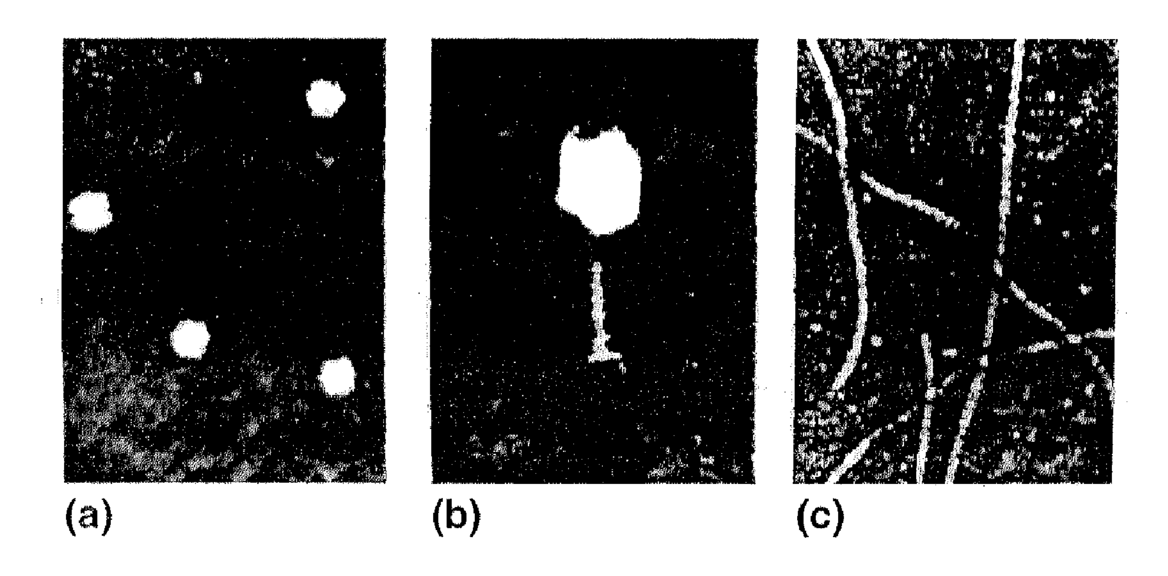
يوجد حتى الآن إستثناء واحد لهذه القاعدة وهو الفاج φ6 والذى يحتوى على ثلاثة جزيئات مختلفة من رنا وكل جزيئ خيطى أى شريطى وثنائى الخيط ويكون إختلاف الجزيئات راجع إلى إختلاف تتابع القواعد النووية. يكون البروتين غلاف حول الحمض النووى ويسمى بالغلاف coat أو الكابسيد capsid ونتيجة لوجود الغلاف فإن الأحماض النووية تصبح محفوظة وفى مأمن من إنزيمات nucleases والمركبات الضارة.

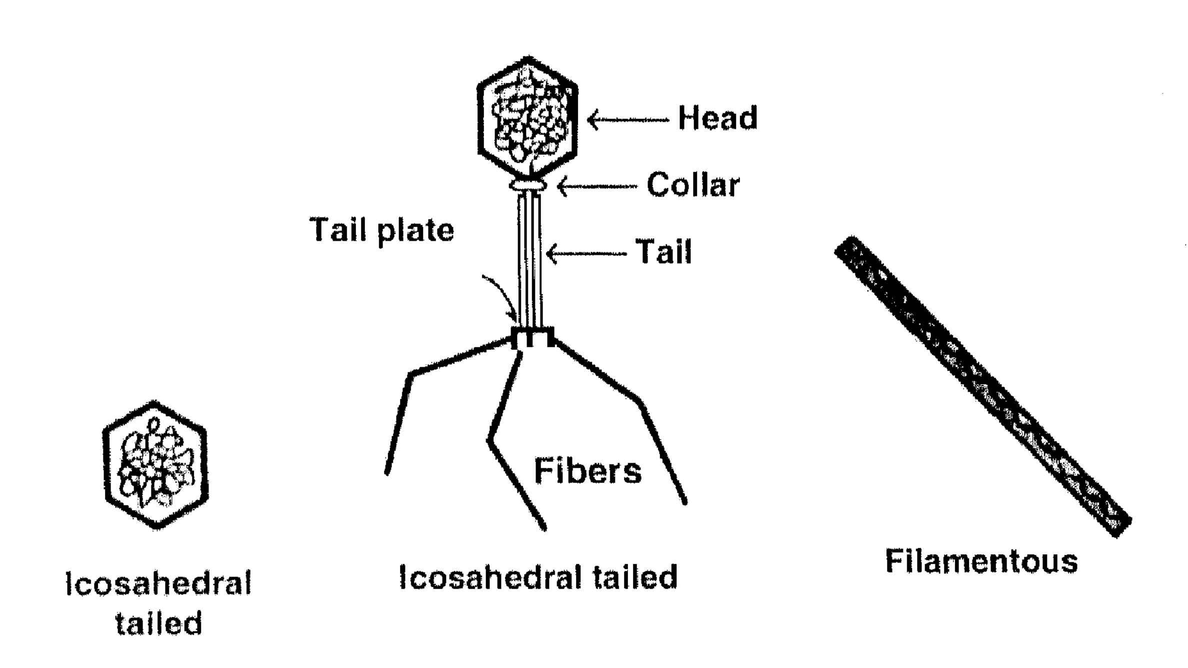
أما عن التركيب الداخلى للفاجات ذات الأشكال المختلفة فهى كما يأتى (شكل ١):

١ - فى حالة الفاجات ذات الرأس المضلعة ذات الذيل أو عديمة الذيل فإن الحمض النووى يوجد فى منطقة مجوفة داخل الغلاف ويكون مندمج بدرجة كبيرة. وفى حالة الفاجات الخيطية فإن الحمض النووى يكون مغمور ومطمور فى الغلاف ويوجد على هيئة غير مندمجة بل يكون على هيئة شريط ممتد وغير مندمج طولى وحلزونى الشكل.

٢ - يعتبر الذيل جزء مكون من مركبات كثيرة أى أنه معقد التركيب وعادة له خيوط تسمى بخيوط الذيل عند القاعدة.

٣ - طول جزيئ دنا فى الفاج عديد الأضلاع أكبر من أى بعد أو أى ضلع فى الرأس.





شكل ١ : الأشكال المورفولوجية الثلاثة الرئيسية للفاج. (a) الفاج icosahedral φX174 وعديم الذيل (منظر سطحى وقطاع)، (b) الفاج icosahedralT4 وله ذيل. بعض الفاجات من هذا النوع ليس لها ياقة collar. ويختلف عدد خيوط الذيل من صفر-٦ ويتوقف ذلك على نوع الفاج (منظر سطحى وقطاع)، (c) فاج خيطى M13 (منظر سطحى وقطاع).

توجد إختلافات كثيرة فى تركيب الفاجات ذات الذيل حيث يمكن أن يكون طول وعرض الرأس متساويين أو يكون الطول أكبر من العرض. يمكن أن يكون الذيل

قصير جدا ويصعب رؤيته بالمجهر الإلكتروني ولكن يمكن أن يتراوح الطول إلى ذيل طويل قد يصل طوله أربعة أضعاف طول الرأس وقد يكون الذيل مرن أو صلب. يمكن أن توجد قاعدة للذيل تكون على هيئة قاعدة مسطحة واسعة **base plate** فى قاعدة الذيل. يخرج من هذه القاعدة عدد من الزوائد الرفيعة تسمى بخيوط الذيل **tail fibers** وهى تتراوح فى عددها من واحد إلى ستة. تسمى قاعدة الذيل بالإنجليزية ف **tail plate**.

مراحل دورة حياة الفاج
Phage Life Cycle Stages

تصنف دورة حياة الفاج إلى طريقتين أو نوعين من الطرق وهما مايأتى. الطريقة الأولى وهى طريقة التحلل **lysis- lytic** والطريقة الثانية وهى طريقة التآلف **lysogenic- lysogeny**. وفى حالة طريقة التحلل يحول الفاج خلية البكتريا إلى مصنع لجزيئات الفاج يتم تخليق وحدات كثيرة من الفاج. وفى حالة الفاج القادر على عملية التحلل فقط يسمى حاد الإصابة **virulent**. أما عن حالة التآلف فقد لوحظت فقط فى حالة الفاجات التى تحتوى على دنا ثنائى الخيط أى الحلزون، وفى هذه الحالة لا ينتج نسل من الفاجات أو جزيئات فاج جديدة بل يصبح دنا جزء من الكروموسوم البكتيرى ويسمى الفاج القادر على عمل حالة التآلف بإسم الفاج المعتدل **temperate**. والغالبية العظمى من الفاجات المعتدلة يمكن أن تقوم بعملية التحلل فى ظروف خاصة. توجد إختلافات كثيرة فى تفاصيل دورة حياة الفيروسات حادة الإصابة ويكون ذلك تبعا للنوع المعين من الفاج. ولذلك سنكتفى بشرح واحد فقط من هذه الفاجات المحتوية على دنا ثنائى الخيط أى الحلزون **ds DNA** (شكل ٢، ٣):

١ – إدمصاص جزيئات الفاج على مواقع إستقبال خاصة **specific receptors** على سطح الخلية البكتيرية: إدمصاص جزيئات الفاج على مواقع إستقبال خاصة وتسمى

هذه المواقع المختلفة بإسم مستقبلات الفاج phage receptors وتوجد على سطح خلية البكتريا. تتكون مستقبلات الفاج من بروتينات أو كربوإيدرات توجد على سطح خلية البكتريا والتى يكون لها وظائف أخرى بالإضافة إلى وظيفة إدمصاص الفاج.

٢ – مرور دنا الفاج من الفاج خلال أى عبر جدار خلية البكتريا: بعض الفاجات لها ذيل طويل والذى يسبب حقن دنا مباشرة فى سيتوبلازم الخلية وذلك بطريقة تشبه الحقن بالحقنة hypodermic syringe- like mechanism. وفى حالة هذه الحالة يمكن نقل دنا مباشرة إلى خلية البكتريا دون التأثر بالوسط المحيط بالبكتريا (شكل ٢). وغير معروف بالتفصيل كيفية نقل الأنواع الأخرى من الفاجات لدنا ومنها الفاجات ذات الذيل القصير ويعتقد أن هذه الفاجات ذات الذيل القصير تنقل دنا إلى بريبلازم خلية البكتريا. وفى حالة الفاجات عديمة الذيل tailless يمكن أن يكون دنا أثناء نقله من الفاج للبكتريا قابل للتحلل بواسطة إنزيم nuclease نيوكلينيز، ولذلك يعتقد أن الغلاف ينكسر أولا ثم يتحرر دنا ويوجد على جدار خلية البكتريا قبل دخوله إلى داخل الخلية. وتوجد آلية غير معروفه حتى الآن عن طريقه نقل دنا خلال غشاء خلية البكتريا إلى السيتوبلازم.

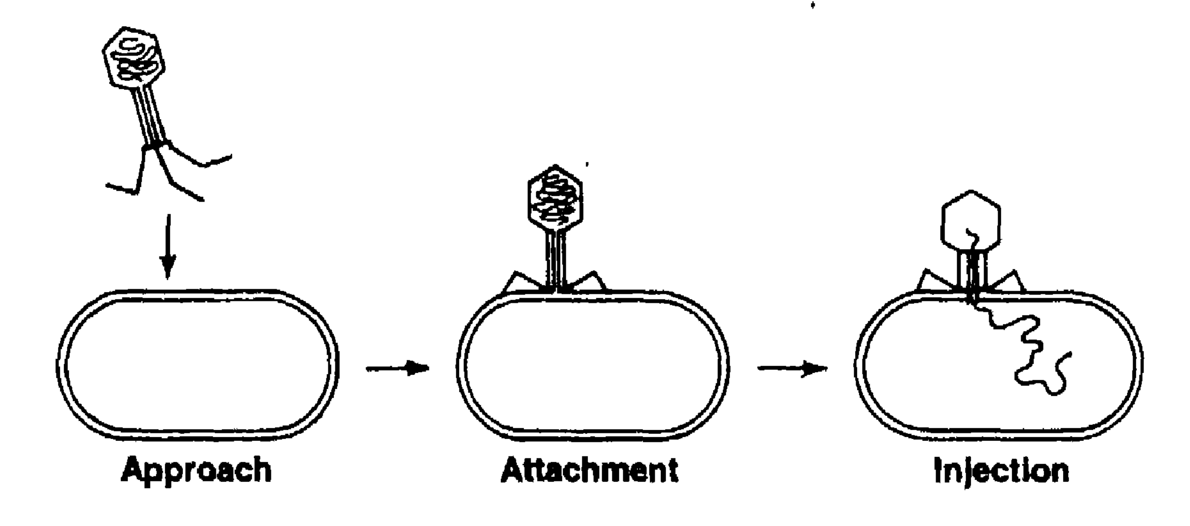
٣ – تحويل الخلية البكتيرية إلى خلية منتجة للفاج: بعد حدوث الإصابة بالفاج فإن خلية البكتريا تفقد قدرتها على تضاعف أى تكرار أو نسخ دنا الخاص بها.

تتوقف الخلية البكتيرية عن تخليق دنا ورنا الخلية البكتيرية يمكن حدوثه بطرق عديدة تتوقف على نوع الفاج. أحد هذه الطرق هى تحليل دنا الخلية البكتيرية. ولكن فقد القدرة على تضاعف أو تخليق دنا أو رنا فى خلية البكتريا أقل حدوثا وشيوعا فى حالة الفاجات العادية ذات الخيط (الحلزون) الواحد من رنا أو دنا ss DNA or RNA.

٤ – إنتاج الحمض النووى والبروتين الخاص بالفاج: يسخر الفاج عادة التحول الغذائى فى خلية البكتريا لصالحه أى لتكوين المركبات الخاصة به، وخاصة الأحماض النووية.

Adsorption
Injection of DNA
Transcription of phage DNA
mRNA
Phage proteins are made replication of phage DNA conversion of bacterium to phage factory
"Factory" bacterium produces phage structures
DNA packaged into phage; assembly of phage particle
Lysis

شكل ٢: دورة حياة فاج.



شكل ٣: خطوات إصابة الفاج لخلية بكتيرية . وهى إقتراب وأدمصـــاص وتثبيـــت وحقن.

يتم إنجاز ما سبق إما بتخليص دنا خاص بالفاج phage- specifice DNA وأيضا إنزيمات بلمرة رنا RNA polymerases أو عن طريق بروتينات الفاج والتى تحور تخصص إنزيمات بلمرة دنا الخاصة بخلية البكتريا. عامة فى كلا الحالتين يتم إستخدام عديد من البروتينات الخاصة واللازمة لتخليق دنا وتكاثر البكتريا. بداية تخليق رنا رسول الخاص بالفاج من دنا الفاج يكون بواسطة إنزيم بلمرة رنا البكتيرى أى الخاص بالبكتريا. ولكن بعد تكوين جزيئات رنا رسول الأولية الخاصة بالفاج، فإنه يحدث تخليق لإنزيمات بلمرة رنا فاجية أى خاصة بالفاج phage- specific أو يحدث تحوير لإنزيمات بلمرة رنا البكتيرية بحيث أنها تتعرف على مواقع خاصة start points لبداية تخليق رنا رسول وهذه المواقع هى منطقة التأهيل promoter (الجمع promoters مناطق التأهيل). وهكذا يتم تنظيم تخليق رنا وتبعا لذلك يتم تخليق بروتينات الفاج فى الوقت المناسب لأحتياجاتها. يوجد أيضا توقيت لنوعية البروتين المتكون فالبروتينات الخاصة بالإنزيمات الخاصة بالفاج يتم تخليقها مبكرا وتسمى بالبروتين المبكر early proteins ويلى ذلك فى الزمن تخليق البروتين التركيبى الخاص بالفاج أى الذى يدخل فى تركيب الفاج structural protein ويسمى بالبروتين المتأخر late protein يتحكم فى زمن تخليق نوعى البروتين أيضا نوعية m RNA رنا رسول. حيث يوجد رنا رسول مبكر early m RNA يتحكم فى تكوين البروتين المبكر، يوجد أيضا رنا رسول متأخر late m RNA يتحكم فى تكوين البروتين التركيبى. تختلف فاجات رنا عن فاجات دنا وحيدة الخيط ssDNA من حيث إستعمال إنزيمات العائل. فاجات رنا قادرة على تخليق الإنزيمات الخاصة بتضاعفها أى تكرارها حيث أن خلايا البكتريا تفتقر هذا النوع من الإنزيمات.

٥ – تجميع جزيئات الفاج لتكوين الشكل النهائى للفاج:

Assembly of phage particles = morphogenesis:

يحتاج تكوين جزيئ الفاج إلى نوعين من البروتينات وهى بروتينات

تركيبيهstructural proteins وهى التى تدخل فى تركيب الفاج والنوع الثانى البروتينات الوظيفيهcatalytic proteins والتى تدخل فى تجميع جزيئات الفاج مع بعضها ولكنها لا تدخل فى تركيب جزيئات الفاج. يوجد أحد أنواع البروتينات الوظيفية يسمى ببروتينات البلوغ أو النضجmaturation proteins وهى مسئولة عن تحويل دنا الموجود بخلية البكتريا إلى شكل أو فورمة قابلة للتعبئة بسهولة فى جزيئ الفاج. فى حالة الفاجات عديدة الأوجه icosahedral يحدث التجميع لجزيئات الفاج على عدة مراحل أو خطوات وهى كما يأتى:

أ – تجميع جزيئات البروتين التركيبى الخاص بالفاج لتكوين رأس الفاج وعند وجود الذيل تتجمع أيضا الجزيئات أيضا لتكوين الذيل كما فى حالة الفاجات ذات الذيل. ولكن حتى هذه الخطوة يكون الذيل منفصل عن الرأس.

ب – تكثيف الأحماض النووية وتعبئتها فى الرأس المتكونة.

جـ– إلتصاق الذيل بالرأس المتكونة والمحتوية على الحامض النووى.

وفى حالة الفاجات الخيطية فإن تجميع الأحماض النووية والبروتينات لتكون جزيئ الفاج تحدث فى خطوة واحدة.

آلية تكثيف الأحماض النووية غير معروفة بالضبط حتى الآن. عادة ينتج من ٥٠–١٠٠ جزيئ فاج لكل خلية بكتيرية. يتوقف عدد جزيئات الفاج فى كل خلية بكتيرية على نوع الفاج وفسيولوجيا العائل.

٦ – تحرر جزيئات الفاج من الخلية البكتيرية: Release of newly synthesized phages فى وقت متأخر من دورة الفاج داخل الخلية البكتيرية تخلق الغالبية العظمى من الفاجات إنزيمات تسبب تحلل الخلية البكتيرية ويوجد فى هذا الشأن نوعين من الإنزيمات وهما:

أ – إنزيم يسبب إختلال أو فساد الغشاء البلازمى يسمى هولين holin.

ب – إنزيم يسبب تحلل جدار خلية البكتريا يسمى ليوزوزيم lysozyme وهو يحلل بالتحديد peptidoglycan الجدار.

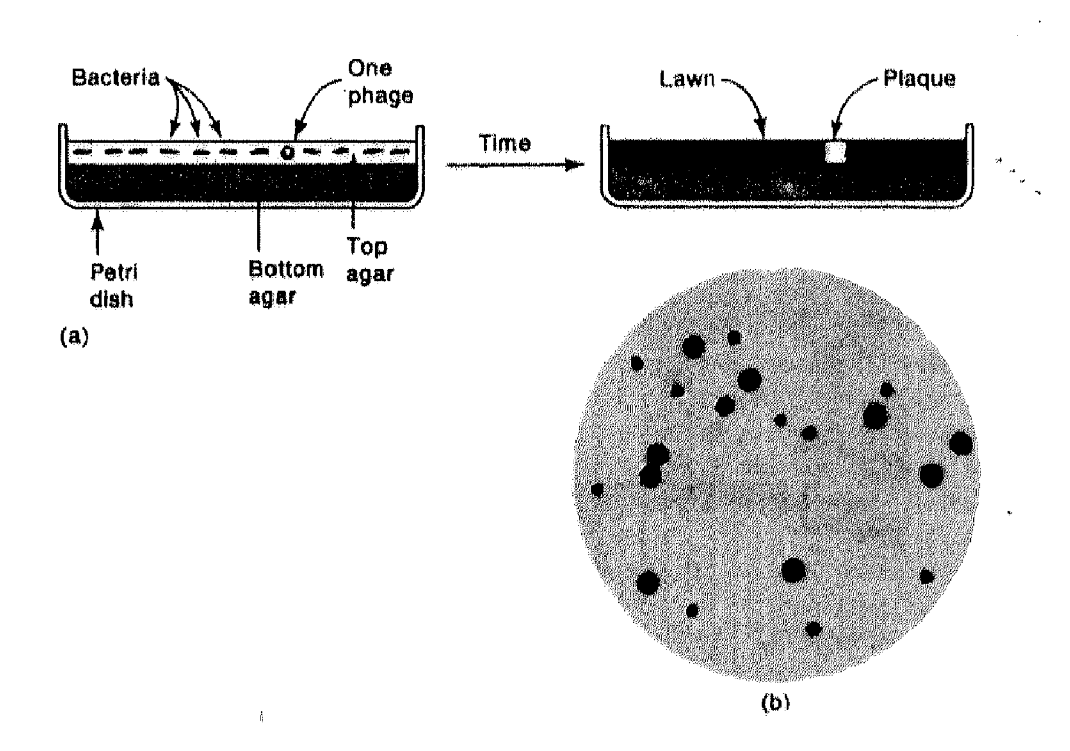
تسبب هذه الإنزيمات إختلال الغشاء البلازمى وفساد وتحلل جدار خلية البكتريا مسببة إنفجار خلية البكتريا وتسمى هذه الحالة بالتحلل lysis. يتحرر الفاج وينتشر فى البيئة المحيطة بخلية البكتريا. يسمى معلق الفاج المتحرر حديثا بإسم lysate ويسمى باللغة العربية معلق الفاج.

قليل من الفاجات الخيطية تتحرر من خلية البكتريا وذلك بطى أى ثنى جدار الخلية للخارج outfolding of the cell wall وتسمى هذه الحالة من التحرر بإسم القذف extrusion وهى لا تسبب ضرر كبير للخلية وفى هذه الحالة تستمر الخلية البكتيرية لمدة أطول فى إنتاج جزيئات جديدة من الفاج.

عد جــزيئات الفاج
Phage Counting

يتم عد جزيئات الفاج بواسطة طريقة plaque أى plaque essay. عند نشر خلايا بكتيرية عددها 10^8 على طبق به آجار فتكون النتيجة 10^8 مستعمرة قريبة من بعضها، وبذلك تتكون طبقة عكره من البكتريا على سطح الآجار تعرف بإسم مسطح البكتريا lawn. وللتغلب على ذلك فإنه يتم عمل ذلك بطريقة أخرى وذلك بخلط ورج خلايا البكتريا مع كمية قليلة من آجار سائل مخفف دافئ. ثم يتم صب ذلك على سطح البيئة الصلبة. يعرف ذلك الآجار المصبوب بإسم الآجار القمى top agar أو الآجار الخفيف soft agar والذى يتجمد بسرعة مكونا طبقة ملساء ومع تكوين مسطح متجانس uniform lawn من البكتريا. تسمى بيئة الآجار الأصلية أى الأولى بإسم الآجار القاعدى bottom agar (شكل ٤). عند وجود

جزيئ فاج واحد فى طبقة الآجار القمى فإنها تدمص إلى خلية بكتيرية فى الآجار ثم يحدث تحلل للخلية البكتيرية ويتحرر منها حوالى مائة جزيئ فاج وكل جزيئ يدمص إلى خلايا البكتريا القريبة وهكذا تتكرر هذه العملية مرات عديدة فى خلايا البكتريا القريبة من بعضها والمتجاورة. هذه الحالة من الدورات العديدة للفاج والتى تستمر لعدة ساعات وينتج عن ذلك أن يدمر الفاج جميع خلايا البكتريا فى منطقة محدودة واحدة من طبقة الآجار القمى وينتج عن ذلك وجود منطقة رائقة خالية من البكتريا مستديرة الشكل وتسمى هذه المنطقة a plaque. وحيث أن جزيئ الفاج الواحد ينتج عنه plaque واحد فإن عدد جزيئات الفاج يمكن حسابه من عدد الـ plaques. يمكن تسمية plaque باللغة العربية هى منطقة مستديرة رائقة خالية من البكتريا.



شكل ٤ : تكوين plaques. (a) بيئة آجار فى طبق بترى وتكوين plaques، (b) Plaques الفاج T4 فى البكتريا إ. كولاى. الصغيرة تم عملها بالنوع البرى من الفاج والكبيرة بواسطة الطفرة r11. تكوين هالة حول plaques الكبيرة نتيجة لإنتشار كميات كبيرة من الإنزيم ليزوزيم والذى يحلل الخلايا الغير مصابة.

درجة كفاءة الفاج فى تكوين plaques أى EOP أى the efficiency of plating تعرف بأنها عدد جزيئات الفاج القادرة على تكوين plaque واحد. تكون درجة الكفاءة تساوى واحد صحيح أو قريبة من الواحد الصحيح لكثير من الفاجات ولكن تكون النسبة أقل من واحد وتتراوح مابين ٠,١ - ٠,٥ فى حالة الفاجات التى تكون plaques صغيرة جدا. عند حفظ وتخزين معلق الفاج فإن EOP تتناقص ويحدث ذلك عادة نتيجة تجمع مواد كيماوية ضارة بالمعلق أو نتيجة دنتره بروتين الفاج. أما عند الحفظ والتخزين فى درجة حرارة ٤٥ مئوية فإنه يقلل من فقد حيوية الفاج. إضافة الكاتيونات والجليسرول والبروتينات يحمى الفاج من الضرر.

خواص مزارع البكتريا المصابة بالفاج

Properties Of A Phage- Infected Bacterial Culture

فى الحالة السابقة تم إفتراض أن خلية بكتيرية واحدة تصاب بجزيئ فاج واحد ويمكن أن يحدث ذلك ولكن عادة تصاب مزرعة البكتريا الواحدة بعدد كبير من جزيئات الفاج. يوجد لذلك طرق لتحليل النتائج لتحليل مدى التداخل بين عشائر الفاجات فى مزارع البكتريا.

عدد جزيئات الفاج والبكتريا المصابة Number of participating phage and bacteria:

يتم إدمصاص جزيئات الفاج على سطح الخلية البكتيرية عشوائيا والإختلاف فى توزيع الفاج بين خلايا البكتريا يمكن وصفه بإستعمال توزيع بواسان poisson distribution وهو كالآتى:

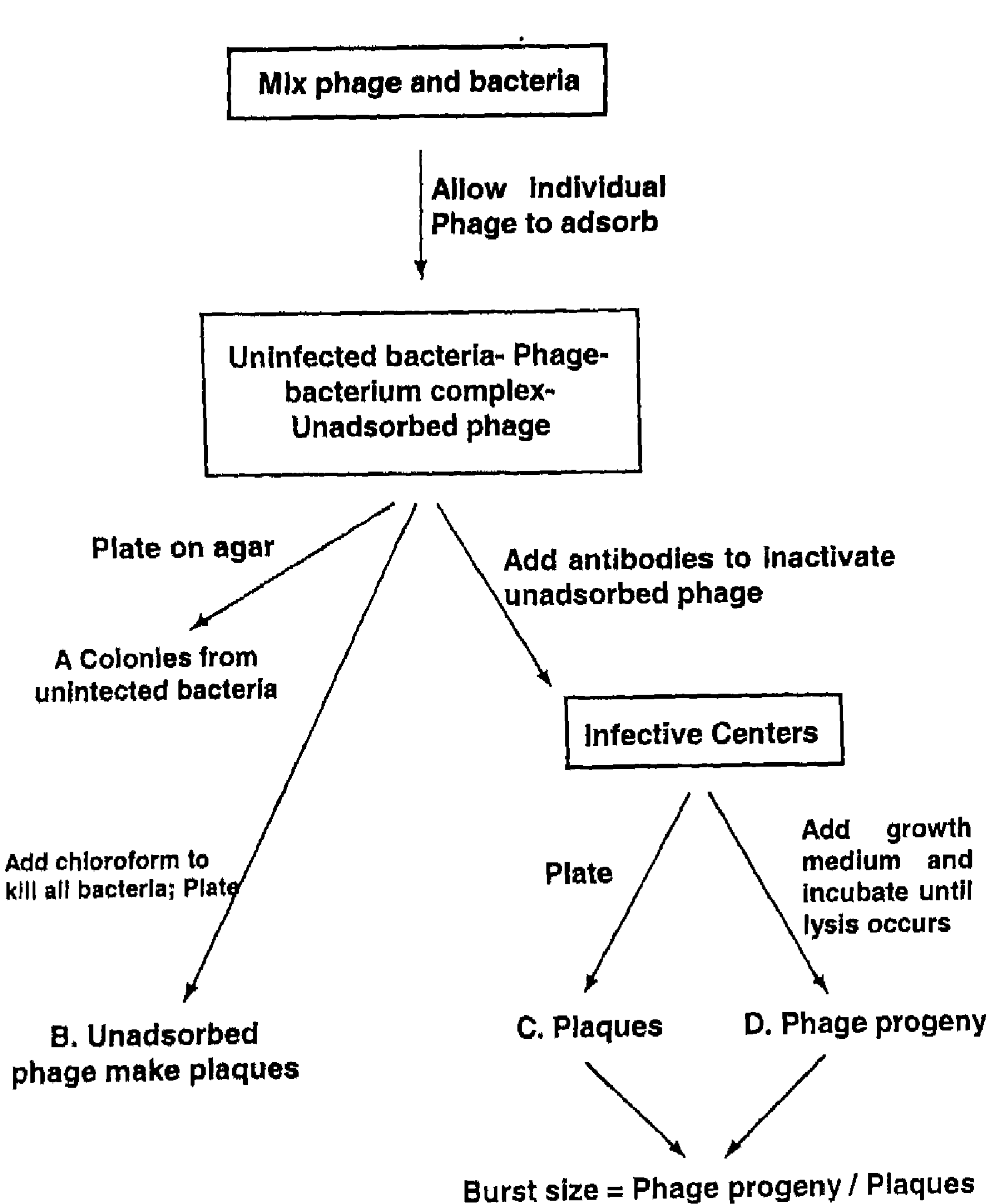
$$P_{(n)} = \frac{m^n e^{-m}}{n!}$$

حيث أن P(n) عبارة عن الجزء من البكتريا fraction of bacteria الذى يدمص عليه عدد من الفاج = n وعندما يكون m هو متوسط عدد الفاجات المدمصة على كل خلية بكتيرية (multiplicity of infection or MOI). ولذلك يكون P أى الجزء من البكتريا fraction of bacteria والذى يدمص عليه عدد من الفاج صفر و ١ و ٢ و ٣ و ... i يكون هو P(O) وP(1) و P(2) و P(3) و .... P(i). ولذلك فلو أن ٣ × ١٠^٨ فاج تم إدمصاصه على ١٠^٨ خلية بكتيرية فإن m = ٣. وتكون قيم P(0) و P(1) و P(2) و P(3) هى ٠,٠٥، ٠,١٥، ٠,٢٢ لأن P(0) = ٠,٠٥ يكون مجموع P(1) + P(2) + ... + P(i) لابد وأن يساوى ١–٠,٠٥ = ٠,٩٥. وبمعنى آخر فإن ٩٥% من البكتريا ستصاب على الأقل بفاج واحد.

لاحظ أيضا أن قيمة P(0) توضح جزئية الفاجات المدمصة أيضا. فى المثال السابق P(0) = ٠,٠٥ فى حالة عندما تكون m = ٣، وذلك بشرط أن تكون جميع الفاجات قد تم إدمصاصها على خلية البكتريا. وفى تجربة خاصة بإستعمال ٣ × ١٠^٨ جزيئ فاج وعدد خلايا البكتريا ١٠^٨ وفى حالة بقاء أن ١٢٪من البكتريا لم تصاب فإن قيمة P(0) = ٠,١٢ وبإستخدام هذه القيمة فيمكن بتطبيق توزيع بواسان p(0) = e^{-m} أن m = ٢,١٢ وهذه القيمة الأخيرة هى القيمة الحقيقية لـــ MOI. وهكذا فإن٢,١٢/٣ = ٧١، أى أن ٧١٪ من جزيئات الفاج المضافة قد تم إدمصاصها.

يمكن قياس P(0) بطريقة سهلة بسيطة (شكل ٥). عند إستعمال عدد معروف من الخلايا البكتيرية والتى سيتم إصابتها. وبعد فترة الإدمصاص فإن معلق البكتريا يمكن تخفيفه وزراعته على بيئة آجار، ثم يتم قياس الجزء من البكتريا القادر على تكوين مستعمرات. وحيث أن الفاج سيحلل خلايا البكتريا المصابة فإن الخلايا البكتيرية الوحيدة القادرة على تكوين مستعمرات هى الخلايا السليمة الغير مصابة بالفاج. وهكذا فإن P(0) يكون عبارة عن عدد المستعمرات المتكونة مقسومة على العدد الكلى للخلايا. وللتأكد من ذلك فإن عدد الخلايا المصابة يمكن قياسه بالطريقة التالية. أو لا يضاف أجسام مضادة إلى المستعمرة المصابة لتثبيط الفاجات الغير مدمصة أى

الحرة. ثم زراعة معلق الفاج على بيئة آجار عليها مسطح من خلايا البكتريا الحساسة للفاج، وفى هذه الحالة فإن كل خلية مصابة والتى تم تنميتها على البيئة قبل التحلل ستنتج plaque واحد. وهذه الخلية التى تكون plaque بهذه الطريقة تسمى بالمركز المعدى infective center.



شكل ٥: يوضح كيفية حساب المراكز المعدية وحجم الإنفجار. (انظر فى الشرح باللغة العربية).

عدد جزيئات الفاج الناتجة عن كل خلية بكتيرية مصابة يسمى حجم الإنفجار size burst. يعتبر حجم الإنفجار هام لأنه يدل على مدى كفاءة البكتريا فى إنتاج الفاج.

يتم قياس حجم الإنفجار وذلك بعد plaques ويمكن حسابه بقياس عدد جزيئات الفاج الناتجة بعد تحلل المزرعة البكتيرية مقسومة على عدد المراكز المعدية.

إنتاج معلق الفاج Production of phage lysate:

يتكاثر الفاج بسرعة أكبر من البكتريا حيث أن البكتريا تتضاعف فى الجيل الواحد بينما عدد جزيئات الفاج فى الجيل الواحد تزيد تبعا لدرجة حجم الإنفجار. يمكن ملاحظة ذلك بالتفصيل من الجدول (جدول ١). وحيث أن جزيئ الفاج الواحد له حجم إنفجار قدره مائة ودورة حياته ٢٥ دقيقة ويصيب واحد مل من مزرعة البكتريا وهى ذات زمن تضاعف قدره ٢٥ دقيقة. وفى الجدول يفترض أن الإدمصاص يحدث فى الحال وكامل. يلاحظ من الجدول أنه بعد أربعة أجيال فإن عدد خلايا البكتريا زاد ١٤ مرة وعدد خلايا الفاج زاد $١٠^{٨}$ مرة. ويلاحظ حتى ذلك الوقت تضاعف خلايا الفاج زيادة ثمانية مرات عن خلايا البكتريا ولذلك فإن جميع خلايا البكتريا قد أصيبت. ولذلك فإنه بعد ١٢٥ دقيقة فإن خلايا البكتريا قد ماتت أو تحللت وأن جزيئ الفاج الواحد الأصلى أنتج نسل تعداده $١,٤ \times ١٠^{٩}$.

بإختيار البيئة المناسبة والظروف البيئية المناسبة للنمو وموعد عدوى أو إصابة الخلايا بالفاج فإنه يمكن تحضير معلق من الفاج يحتوى على تركيز مرتفع من جزيئات الفاج. ومثال ذلك عند تنمية P22 وبإستعمال بيئة مناسبة جيدة التهوية وأن يكون تركيز خلايا البكتريا فى ١ مل هو $١٠^{٨}$ ($١٠^{٨}$ خلايا/مل) ودرجة MOIهى ٠,٠١. فإن عشر هذه الخلايا ($١٠^{٧}$ خلية/مل) تصاب ويتحرر منها فاج بمعدل ٥٠ فاج لكل خلية. وبمرور الزمن فإن تركيز الخلايا البكتيرية المصابة يصبح $١٠^{٩}$ خلية/مل.

كما أن MOI تكون ٥ وتصاب جميع البكتريا، وبعد دوره إضافية للفاج يصبح تركيزه حوالى ٥ × $١٠^{١٠}$ لكل ملليلتر.

يمكن الحصول على تركيز عال من الفاج وذلك بتنمية البكتريا على بيئة صلبة وأستعمال كمية من الفاج تسبب إصابة جميع خلايا البكتريا وتسبب لها تحلل. ومثال ذلك لو أن $١٠^{٦}$ جزيئ فاج وضعت فى آجار ناعم soft agar مع بكتريا بتركيز $١٠^{٨}$، فإنه بعد ٦ ساعات فإن طبقة الآجار الناعم تصبح رائقة تماما وتحتوى على $١٠^{١١}$ جزيئ فاج. يسمى هذا بإسم معلق فاج طبقى plate lysate. يمكن تحضير معلق فاج طبقى من plaque واحد بالطريقة التالية. وهى غمس خلة أسنان أو سلك فى مركز plaque ثم غمر وهز هذه الخلة أو السلك فى آجار ناعم سائل liquid soft agar يحتوى على خلايا بكتيرية. يصب الآجار الناعم فى طبق ثم يترك ليتصلب. عادة يكون قد تم نقل حوالى $١٠^{٦}$ فاج ولذلك يحدث تحلل مناسب لخلايا البكتريا.

جدول ١: تركيز الفاج والبكتريا فى الأجيال المختلفة

	التركيزات		
عدد		خلايا البكتريا / مل	
الأجيال	عدد فاج/مل	تقريبى	بالضبط
0	1	10^6	10^6
1	10^2	2×10^6	$2 \times (10^6 - 1)$
2	104	4×10^6	$(4 \times 10^6) - (2 \times 102) - 4$
3	10^6.	7.98×10^6	$(8 \times 10^6) - (2 \times 10^4) - (4 x 10^2) - 8$
4	10^6	1.4×10^7	$(1.6 \times 10^7) - (2 \times 10^6) - (4 \times 10^4) - (8 \times 10^2) - 16$
5	1.4×10^9 $= 100 \times (1.4 \times 10^7)$	0	0

منحنى النمو ذو الخطوة الواحدة One-step growth curve:

بعض حركيات kinetics إصابة الخلايا البكتيرية بالفاج يمكن دراستها بدراسة

المزرعة المصابة. توجد تجربة خاصة بذلك تسمى تجربة منحنى النمو ذو الخطوة الواحدة. وفى هذه التجربة تستخدم مزرعة ويتم إصابتها بدرجة من MOI تساوى ٠,١ وذلك للتأكد من أن خلية البكتريا الواحدة تم إصابتها بجزيئ فاج واحد وليست بواسطة أكثر من جزيئ فاج واحد. ثم يضاف أجسام مضادة لتثبيط جزيئات الفاج الحرة أى غير المدمصة على سطح الخلية البكتيرية. ثم يتم تخفيف خلايا البكتريا المصابة إلى ألف مرة بواسطة بيئة طازجة دافئة وذلك لمنع تثبيط الأجسام المضادة للنسل الناتج من الفاجات الناتجة من البكتريا المصابة. وبعد فترات أو أزمنة مختلفة يتم عمل طرد مركزى وأخذ تركيزات من رائق supernatant الطرد المركزى ويتم نشره على مسطح بكتريا حساس. وفى الفترات الأولى يكون عدد plaques ثابت (شكل ٦) حيث أن plaques تتكون بواسطة الفاج الذى يتحرر متأخرا من الخلايا المصابة الغير متحللة وذلك فى أثناء هذه الفترة والتى تسمى بفترة الركود latent period. بعد فترة معينة من إصابة الخلايا البكتيرية بالفاج، وهذه الفترة تختلف بإختلاف الفاج، فإن عدد plaques يزداد حيث أن الخلايا المصابة بالفاج تتحلل فى أثناء هذه الفترة، خلال هذه الفترة الزمنية القصيرة والتى تسمى بإسم فترة الزيادة rise period فإن الخلايا المصابة تتحلل.

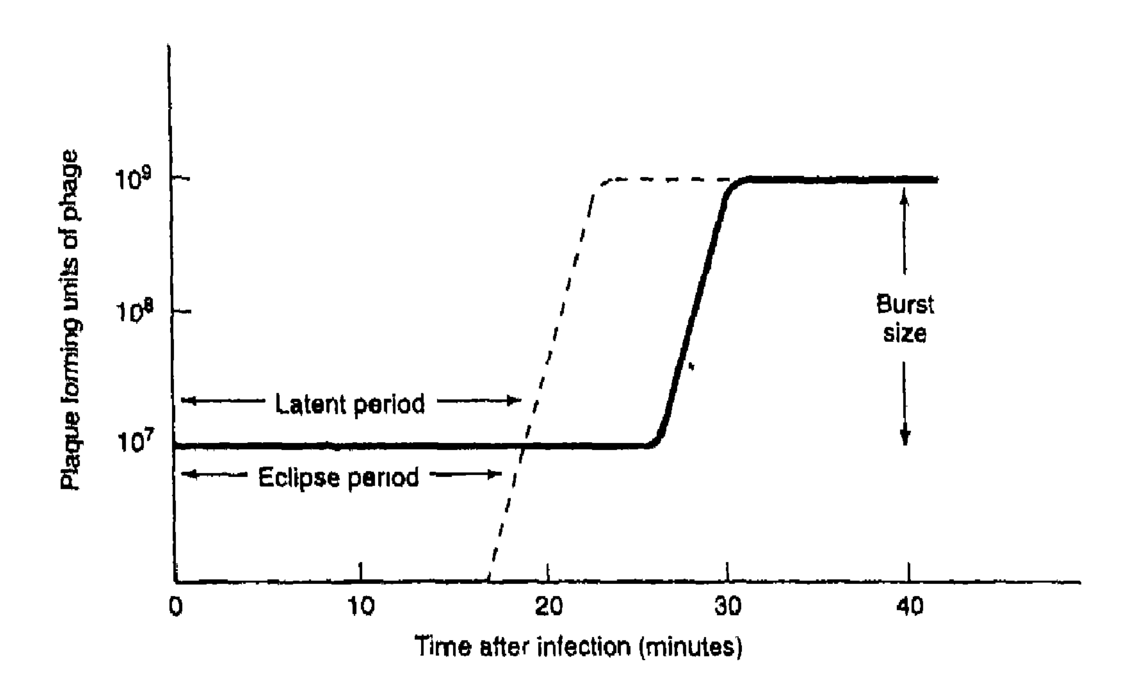
عندما تتحلل جميع خلايا البكتريا فإن عدد جزيئات الفاج تبقىً ثابتة. تعتبر النسبة بين كمية جزيئات الفاج المنتجة إلى العدد الإبتدائى initial number للمراكز المعدية هى عبارة عن حجم الإنفجار. يعتبر عدد الدقائق اللازم قبل زيادة عدد plaques عبارة عن زمن التحلل lysis time.

يمكن تحويل هذه التجربة لكى تستخدم فى دراسة حركيات الفاج فى داخل الخلية البكتيرية (شكل ٦) وذلك بإضافة الكلورفورم على فترات مختلفة بعد الإصابة. يحطم الكلورفورم أغشية الخلية ويسبب تحلل ماقبل النضج premature lysis للخلايا المصابة. وفى هذه الحالة تعتبر الزيادة فى عدد plaques دليل على كمية جزيئات

الفاج داخل الخلية البكتيرية وكلما زادت عدد plaques كلما زادت عدد جزيئات الفاج داخل الخلية البكتيرية.

ـريقة الإنفجار المفرد Single- burst technique:

حجم الإنفجار لفاج معين هو عبارة عن متوسط عدد جزيئات الفاج الناتجة عن الخلية الواحدة ولكنه لا يوضح مدى إختلاف حجم الإنفجار من خلية إلى أخرى. تجربة الإنفجار المفرد يمكن أن توضح معلومات هامة عن مدى الإختلاف بين خلية وأخرى.



شكل ٦: منحنى نمو ذو خطوة واحدة إفتراضى. خلايا البكتريا بتركيز ١٠^٨ خلية/مل وتم إصابتها بقيمة هى عبارة MOI = ٠,٠١ تم إضافة المصل المضاد antiserum لتثبيط الفاج الحر الغير مدمص ثم بعد ذلك تخفف المزرعة ألف مرة. المنحنى المستمر يوضح عدد plaques لكل مل من المزرعة البكتيرية، أما المنحنى المتقطع يوضح ذلك تماما ولكن بعد حدوث تحلل ماقبل النضج للخلايا البكتيرية نتيجة إضافة إنزيم الليسوزيم lysozyme والكلوروفورم. حجم الإنفجار =١٠٠.

يمكن تلخيص تجربة الإنفجار المفرد فى أنه بعد إدمصاص الفاج على خلايا البكتريا فإنه يتم بعد ذلك تخفيف هذه الخلايا فى بيئة مغذية بدرجة كبيرة بحيث يصبح تركيز الخلايا منخفض، عادة يكون التركيز ٠,٠٥ خلايا مصابة لكل مل، ثم يتم أخذ ١ مل لمرات عديدة وتخفيف كل ١ مل لمرات عديدة فى مئات أو آلاف من أنابيب الإختبار. وتبعا لتوزيع بواسان وعند هذا التركيز فإن ٩٥,١% من الأنابيب لا تحتوى على خلايا مصابة، ٤,٨% من الأنابيب يحتوى خلية مصابة واحدة وأن ٠,١% من الأنابيب يحتوى على أكثر من خلية مصابة. ولذلك فإن ٩٨% من الأنابيب المحتوية على خلايا مصابة تحتوى خلية واحدة مصابة فقط. يسمح للخلية المفردة فى كل أنبوبة أن تتحلل وأن محتويات كل أنبوبة يتم فردها أى نشرها فى طبق بترى به مسطح من خلايا بكتريا حساسة للفاج ولذلك فإن plaques تتكون. وتبعا لذلك فإن عدد plaques فى الطبق الواحد هو عبارة عن عدد جزيئات الفاج فى الخلية البكتيرية الواحدة أى نسل الفاج لخلية بكتيرية واحدة. ولذلك فإن عدد plaques فى أطباق بترى المختلفة يوضح توزيع حجم الإنفجار والذى يتراوح بين أقل من ١٠ إلى عدة مئات. يلاحظ أنه توجد أطباق بترى فارغة كثيرة حيث أنه عند دراسة مائة خلية مصابة فإنه يلزم ألفين طبق بترى منها ١٩٠٠ طبق فارغة لا تحتوى plaques.

من مزايا هذه الطريقة أنه يمكن دراسة نواتج التهجين بين الفاج فى خلية البكتريا أى دراسة النسل الناتج من التهجين بين الفاج أو الفاجات فى خلية البكتريا.

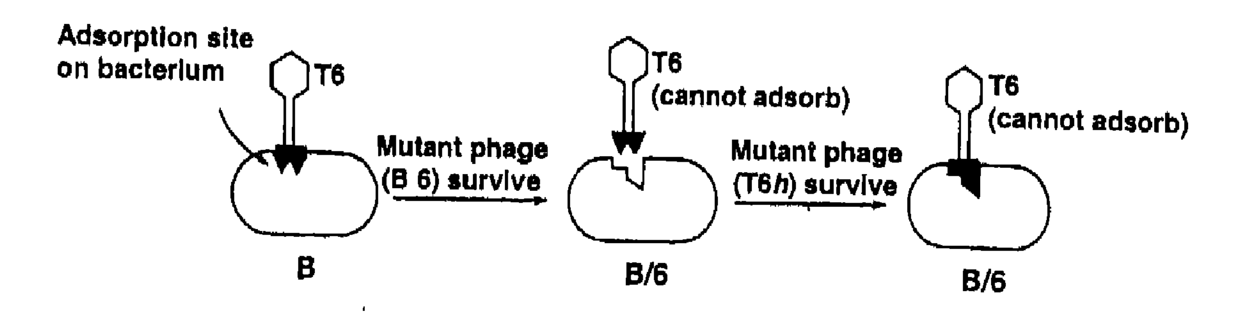
التخصص فى إصابة البكتريا
Specificity In Phage Infection

تم عزل آلاف من طرز الفاج المختلفة. قابلية فاج معين لإصابة خلية بكتيرية يكون دائما محدد لنوع واحد من البكتريا فقط وأحيانا يكون التخصص أكثر من ذلك حيث تحدث الإصابة لعدد من قليل من السلالات فى داخل النوع الواحد. أى أنه يوجد

تخصص واضح فى إصابة الفاج للبكتريا ومثال ذلك أن الفاج P22 يصيب البكتريا *Salmonella typhimurium* ولا يصيب البكتريا إ. كولاى. توجد عوامل كثيرة هى التى تتحكم وتحدد هذه التخصصية للفاج. أحد هذه العوامل هى قابلية الفاج للإدمصاص. ومثال ذلك أن الفاج P22 لا يمكن أن يدمص على سطح الخلية إ. كولاى لأن هذه البكتريا ينقصها مناطق إستقبال خاصة **specific receptors** للفاج P22 على سطح خلية البكتريا، وهذه المناطق هى المسئولة عن إدمصاص هذا الفاج. أى أن مناطق الإستقبال الخاصة بهذا الفاج غير موجودة. تخضع العلاقة بين الفاج والبكتريا والتفاعل بينهما لإنتخاب وراثى. حيث أنه أمكن عزل طفرات بكتيرية مقاومة للفاج وأيضا وجد العكس أن طفرات فى الفاج تسبب وجود إصابة لسلالات من البكتريا لم تكن تصاب قبل ذلك **new host specificity**. ومثال لذلك أنه أمكن إصابة خلايا البكتريا إ. كولاى من نوع الخلايا B وكان عدد خلايا البكتريا $١٠^{٨}$ وعدد جزيئات الفاج T6 هى $١٠^{١٠}$ وتم وضع الخلايا البكتيرية المصابة على سطح الآجار وتم تكوين ١٠٠ مستعمرة (أى خلية لكل $١٠^{٦}$). وبأخذ بكتريا هذه المستعمرات وعمل مزارع منها فإن المزارع الناتجة يمكن أن تحتوى على طفرات فقدت قدرتها على قابليتها للإصابة بالفاج T6 ولذلك فإن هذا الفاج غير قادر على الإدمصاص على هذه الطفرات. هذه الطفرات فى خـــلايا البكتريا لم تنشأ فى هذه الأثناء بل كانت موجــودة وتم إكتشافها نتيجة للإنتخاب أثناء زراعتها ونموها وتكاثرها نتيجة لوجود أعداد كبيرة من جزيئات الفاج. هذه الطفرات المقاومة تسمى **T6 resistant** أو Tsx^r (شكل ٧).

عند وضع $١٠^{٨}$ خلايا بكتريا من الطفرة Tsx^r على بيئة آجار لتكوين مسطح بكتيرى **lawn** وبعد ذلك يتم وضع $١٠^{٨}$ جزيئات فاج T6 فإن عدد البقع الرائقة **plaques** حوالى عشرة. يحمل الفاج فى هذه البقع الرائقة طفرة فى جين خاص بخيوط الذيل ونتيجة لهذه الطفرة فإنه يستعيد القدرة على الإدمصاص على خلايا

Tsx^r. تسمى هذه الطفرة بإسم طفرة h (مشتقة من host range). هذه الطفرة عادة تستعيد القدرة على تكوين بقع رائقة فى مزارع بكتريا Tsxs ولذلك يسمى هذا النوع من الطفرات بأنها ذات مدى عوائلى واسع extended host range.



شكل ٧: تكوين طفرة فى خلية البكتريا تمنعها من إدمصاص الفيرس B/6 وطفـــرة فى الفاج T6h تجعله قابل للإدمصاص مرة أخرى على هذه البكتريا.

عند حدوث إصابة للمزرعة البكتيرية بواسطة الفاج البرى wild type أى العادى والذى يرمز له +T6h والفاج *T6h* بدرجة تكاثر تسمح بأن خلايا البكتريا تصاب بطرازى الفاج. فإنه من المتوقع أن جميع نسل الفاج يكون بقع رائقة على السلالة البكتيرية B، حيث أن السلالة البكتيرية B يمكن أن تصاب بطرازى الفاج السابقين. وأن نصف النسل عبارة عن طفرة h والتى يمكن زراعتها على أطباق بها الطفرات البكتيرية Tsx^r. ربع النسل فقط يكون بقع رائقة على الطفرات البكتيرية Tsx^r. والسبب فى ذلك أنه أثناء تجميع الفاج لا توجد آلية قادرة على عمل توافق وتقابل وإمتزاج بين جزيئ دنا له العامل *h* مع طفرة الطراز *h* لخيوط الذيل h- type tail fiber. ولذلك فإن ١/٢ عدد الفاج الذى تركيبه *h*D Na يكون فى جزيئات h^+ (h^+ particles). وبالتالى لا يدمص على البكتريا Tsx^r. يشابه ذلك تماما، وجود جزيئات دنا h^+ فى جزيئات h (h particles) فإنه يحدث لها إدمصاص على البكتريا Tsx^r ولكنها تنتج نسل h^+ والتى لا يمكنها أن تكرر دورات الإصابة. هذه الظاهرة تسمى phenotypic mixing.

المنع أو التحديد العوائلى (المقاومة) والتحوير

Host Restriction And Modification

يمكن للفاج إصابة أنواع عديدة من البكتريا ولكنه غير قادر على إصابة أنواع أخرى من البكتريا، حيث أن البكتريا الأخيرة يكون لها تركيب ونظام معين يكون بمثابة حاجز يمنع الإصابة بالفاج. يسمى هذا بالمنع أو التحديد العوائلى أو المقاومة host restriction والتحوير modification. يمكن توضيح هذه الظاهرة بأن البكتريا من النوع X قادرة على تمييز الفاج النامى على البكتريا X وتعتبر قابلة الإصابة به ولكنها أيضا قادرة على تمييز الفاج الذى ينمو على الطراز Y من البكتريا وتصبح البكتريا X قادرة على منع إصابتها والوقاية من الفاج Y. عند نمو الفاج P فى بكتريا من طراز X يسمى الفاج P(X). حالة التحديد العوائلى والتحوير يمكن توضيحه كما فى الجدول (جدول ٢).

جدول ٢: التحديد العوائلى والتحوير للبكتريا *E. Coil* والفاج لامدا.

نوع السلالة	نوع الفاج		
البكتيريا	λ(K)	λ(B)	λ(C)
K	1	10^{-4}	10^{-4}
B	10^{-4}	1	10^{-4}
C	1	1	1

ملحوظة: تدل الأرقام على كفاءة الفاج النسبية relative plating efficiency.

يلاحظ أن الفاج λ(K) والذى ينمو فى سلالة البكتريا إ. كولاى أى الطرز K تكون بقع رائقة plaques بكفاءة منخفضة فى السلالة B. وهكذا فإن الفاج λ(K) تكون ممنوعة أى محددة بالسلالة B (is restricted by strain). ولذلك فإن عشيرة الفاج λ(K) فى هذه plaques البقع الرائقة القليلة أو نادرة العدد تعتبر محورة بالسلالة B ولذلك فإن الفاجات المحورة تنمو بكفاءة فى السلالة B. أيضا الفاج

λ(B) يفشل فى النمو فى السلالة K أى أنه ممنوع أو محدد بالسلالة k. يحدث هذا التحديد نتيجة لتكوين إنزيم قطع داخلى لدنا محدد خاص a specific restriction endonuclease بواسطة الخلية المستقبلة. مثال ذلك أن إ. كولاى B تحتوى إنزيم قطع داخلى لدنا محدد يسمى *Eco* B nuclease وهذا الإنزيم يقطع شرائط دنا DNA strands عندما مكان قريب من تتابع قواعد خاص معين. وحيث أن الكثير من إنزيمات القطع الداخلى لدنا المحددة تسبب القطع فى مكان داخل تتابع القواعد المعين ولكن يشذ عن ذلك *Eco* B والذى يقطع بالقرب من تتابع القواعد المحدد وليس فى داخلها. يعتبر الفاج λ(K) محتوى على هذا التتابع، ولذلك عند حقن دنا الخاص بهذا الفاج فى إ. كولاى B فإن هذا الدنا يحدث له تحلل. البكتريا إ. كولاى B تحتوى أيضا هذا التتابع وبذلك يمكن أن تحلل وتحطم دنا الخاص بها إلا فى حالة حدوث تحوير لهذا التتابع. يوجد إنزيم محدد الموقع وهو *Eco* B methylase يحدث عملية إدخال مجموعة الميثيل methylation فى الأدينين الموجود فى القواعد المتتابعة وهكذا يصبح هذا التتابع للقواعد المكون لدنا مقاوم لإنزيم نيوكلينيز *Eco* B nuclease. عند إصابة الفاج λ(K) للسلالة B فإن قليل من جزيئات الفاج فى العدد الكبير من خلايا البكتريا المصابة يحدث لها عملية إدخال مجموعة الميثيل قبل أن يحدث لها منع restriction. وهكذا فإنه فى هذا العدد القليل من الفاج السابق ذكره يكون قد تم تحاشى عملية المنع وهكذا فإن قليل جدا من عشيرة الفاج حدث لها حالة تحور تسمى تحور B modification B وهكذا يتم إنتاج جزيئات فاج محورة قادرة على التكاثر وعمل قليل من plaques لأن عدد هذه الفاجات المحورة قليل. حالة البكتريا إ. كولاى K فإنها تحتوى أيضا إنزيم قطع داخلى لدنا محدد يسمى *Eco* K. وهذا الإنزيم يحلل تتابع قواعد يختلف عن تتابع القواعد الذى يتم تحلله بواسطة *Eco* B. وجد أن الإنزيم *Eco* K methylase يحمى البكتريا إ. كولاى من التحلل الذاتى لخلاياها وينتج عن ذلك التحور K أى

Kmodificatio. الفاج لامدا λ الذى ينمو دائما فى السلالة K ويسمى λ(K) يحدث له عملية إدخال مجموعة ميثيل فى التتابع الخاص المعروف باسم *Eco* K وبالتالى يصبح مقاوم لإنزيم نيوكلييز Eco K nuclease Eco K *Eco*. على أى حال فإن الفاج λ(B) لها تتابع قواعد *Eco* K خال من مجموعة الميثيل، ولذلك فإن دنا الخاص بالفاج λ(B) يتحلل عند دخوله إلى خلية بكتيرية من النوع K.

ولكن يحدث أحيانا فى هذه الحالة أن بعض قليل من جزيئات دنا للفاج λ(B) تتحاشى وتقاوم المنع وتتكاثر ويكون ناتج التكاثر تكوين جزيئات فاج ذات تتابع قواعد معين من K حدث له عملية إدخال مجموعة ميثيل. ولذلك فإن النسل النادر لهذا الفاج الناتج من إصابة الفاج λ(B) بنجّاح للبكتريا إ. كولاى K يكون عبارة عن الفاج λ(K). وهذا الفاج الأخير ينقصه التحور B modification B ويحدث له منع عند إصابة السلالة B.

يتضح من الجدول (جدول ٢) أن سلالة الفاج التى تنمو على البكتريا C وتسمى λ(C) وهى تفشل فى النمو جيدا على السلالات B، K ولكن ليست λ(B)، λ(K) ممنوعة بواسطة السلالة C. والسبب فى غياب عملية المنع هو أن السلالة C ليس لها إنزيم نيوكلييز فعال ونشط ضد أى تتابع للقواعد فى دنا الفاج لامدا. الفاج λ(C) ممنوع بكل السلالات البكتيرية B، K لأن السلالة C لا تمتلك إنزيمات *Eco* K methylases، *Eco* B.

ولذلك فإن عملية المنع (التحديد) والتحوير شائعة الحدوث فى البكتريا ربما يكون ذلك لأنها تدمر وتحلل دنا البكتريا الغريب.

دورة الفاج المعتدل

Lysogenic Cycle

يوجد نوعين من دورة الفاج المعتدل. وأكثر النوعين أو الدورتين شيوعا هى النوع أو الدورة الخاصة بالفاج لامدا λ الخاص بالبكتريا إ. كولاى، وخطوات هذه الدورة كما يلى (شكل ٨):

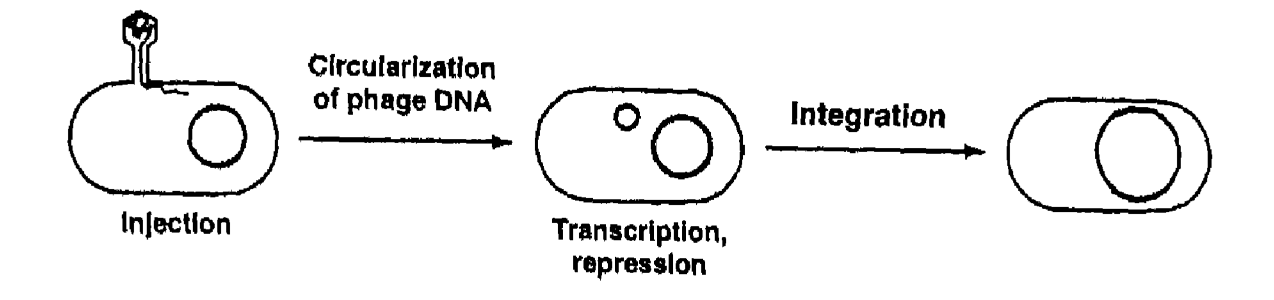
١ - يتم حقن دنا الفاج فى خلية البكتريا.

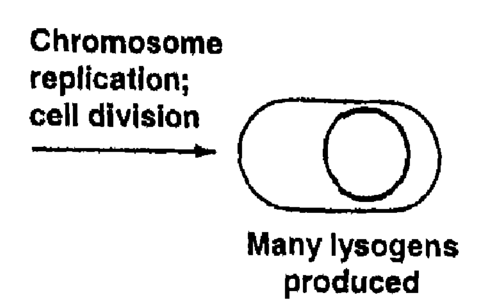
٢ - بعد مدة قصيرة من تخليق رنا رسول، فإن المركب الأخير أى رنا رسول يستخدم فى تخليق مثبط بروتينى التركيب. هذا المثبط يسبب تثبيط تخليق رنا رسول الخاص بدورة التحليل أى lytic cycle أى أن المثبط يثبط رنا رسول الخاص بإنجاز دورة التحليل lytic functions. أيضا بعد مدة قصيرة من تخليق رنا رسول فإنه يتم تخليق إنزيم وظيفته عمل إرتباط أو إعادة صياغة فى مواقع معينة a site specific recombination enzyme. يمكن أيضا أن يتوقف تخليق رنا رسول الخاص بالفاج بواسطة المثبط.

٣ - حدوث إرتباط وتآلف وإعادة صياغة recombination بين جزيئ دنا الفاج وجزيئ دنا البكتريا. أى حدوث إرتباط بين دنا الفاج مع الكروموسوم البكتيرى.

٤ - يستمر نمو وتكاثر البكتريا وبالتالى يتكاثر جزيئ دنا الفاج بما يحمله من جينات كجزء من الكرموسوم البكتيرى.

أما عن النوع الثانى أى الدورة الثانية للفاج وهى الأقل شيوعا تختلف عن السابقة فى أن دنا الفاج لا يلتحم بالكرموسوم البكتيرى بل يظل منفصل عنه تماما على هيئة بلازميد أى على هيئة دنا حلقى قابل للتكاثر، ومن أمثلة ذلك فاج PI الخاص بالبكتريا إ. كولاى.





شكل ٨: خطوات عملية lysogenization أى إدخال جزيئ دنا الفاج فى الكروموسوم البكتيرى

الخواص العامة للفاج المعتدل General properties of lysogens :

يمكن تلخيص الخواص العامة للفاج المعتدل كما يأتى:

١ - يسمى الفاج القادر على عمل دورة حياة تآلف مع الكروموسوم البكتيرى باسم الفاج المعتدل a temperate phage. يمكن أحيانا لهذا الفاج أن يحدث تحلل أى دورة حياة تحليل لخلية البكتريا lytic cycle.

٢ - تسمى البكتريا المحتوية على مجموعة كاملة من الجينات الخاصة بالفاج باسم ليسوجين lysogen.

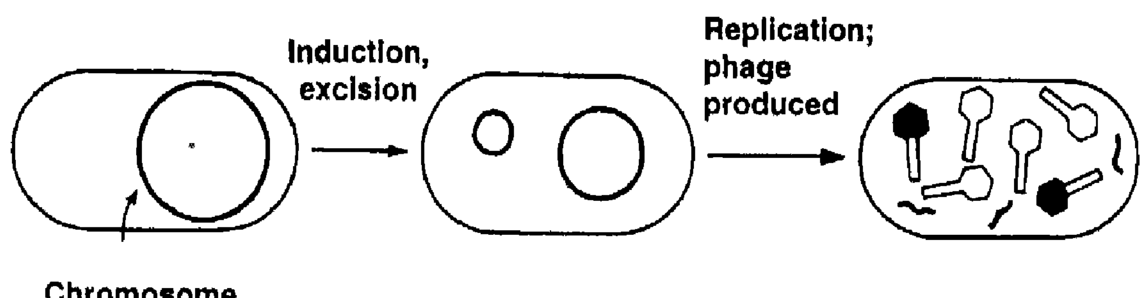
٣ - عند إحتواء خلية بكتريا دنا الفاج بحيث يصبح ملتحم بكروموسوم الخلية البكتيرية يسمى دنا الفاج فى هذه الحالة بإسم دنا المكمل integrated. تسمى الطريقة التى يتم بها إحتواء دنا البكتريا لدنا الفاج بالتكامل integration أو بالإدخال أو التداخل insertion.

عندما يوجد دنا الفاج على هيئة بلازميد يعتبر غير مكمل nonintegrated. عندما يوجد دنا الفاج داخل خلية البكتريا lysogen سواء كان مكمل أو غير مكمل يسمى بروفاج أو الفاج الأولى prophage.

توجد خاصيتين هامتين لخلية البكتريا المتآلفة مع الفاج أى lysogen وهما ما يأتى:

١ - أن خلية البكتريا المتآلفة مع الفاج أى ليسوجين تصبح منيعة بعد إصابتها بالفاج وتصبح غير قابلة للإصابة بنفس الفاج. تسمى حالة المقاومة للإصابة هذه بالمناعة immunity.

٢ - بعد عدد من الأجيال لخلية البكتريا المتآلفة فإنه يمكن أن تتحول إلى الحالة الأخرى وهى أن خلية البكتريا تتحلل وتسمى هذه الحالة بالتحلل lysis وهذه الحالة تسمى بالتحول التحللى لإنتاج جزيئات الفاج induction. وفى هذه الحالة فإن جينات الفاج تنفصل من الكرموسوم البكتيرى على هيئة قطعة واحدة من دنا أى جزيئ واحد من دنا أى شظية واحدة من دنا (شكل ٩).



شكل ٩: خطوات حدوث التحول التحللى لخلية البكتريا ليسوجين لإنتاج الفاج induction.

أكثر من ٩٠% من آلاف الفاجات المعروفة تعتبر من النوع المعتدل. هذه الفاجات المعتدلة غير قادرة على عمل إنفجار بأعداد كبيرة للخلايا البكتيرية كما هو الحال فى الفاجات المحللة lytic والمسببة لإنفجار خلية البكتريا مثل الفاج T7 والفاج T4 ولكن الفاجات المعتدلة تعوض ذلك بأنه يمكنها التكاثر فى ظروف بيئية غير مناسبة للتكاثر. عامة فى حالة البكتريا النشيطة التكاثر نتيجة لتوفر ظروف البيئية الملائمة فإن إصابة خلية واحدة بالفاج ينتج عنها إنتاج أعداد هائلة من الفاج فى نسلها وكما سبق شرحه وتقديره عدديا، ولكن فى حالة البكتريا غير النشيطة التكاثر لقلة أو ندرة المواد الغذائية فى البيئة وكثيرا ما يحدث ذلك فى البكتريا فإن الفاج يكون غير قادر على التكاثر بداخل هذه البكتريا لأن الفاج لا ينقسم إلا داخل الخلايا النشطة.

عند تجويع البكتريا starved of nutrients فإنها تحلل رنا رسول والبروتين الخاص بها قبل أن تدخل فى دور سكون. إضافة المواد الغذائية إلى البيئة تمكن البكتريا من النمو والتكاثر مرة أخرى ولكنها لا تفيد فى تكاثر الفاج، حيث أن الفاج يكون تأثر بتحلل رنا رسول والبروتين وهكذا لا يتكاثر وهكذا تفقد هذه الخلية البكتيرية قدرتها على إنتاج الفاج نهائيا permanently lost وهذا صحيح فقط فى حالة الفاج المحلل. يعتقد أن فقد هذه القدرة للخلية البكتيرية لع علاقة بتحلل رنا رسول والبروتين الخاص بالخلية البكتيرية. العكس صحيح فى حالة خلية البكتريا ليسوجين فإن الفاج يمكن أن يعيش فى الخلية الساكنة حيث أن دنا الفاج يصبح كامن أو ساكن. ولكن عند إستعادة هذه الخلية الساكنة لحيويتها ونموها وإنقسامها فى الخلية ليسوجين فإن جينات الفاج تتكرر أى تتضاعف أى تتكاثر فى العدد كجزء من الكرموسوم البكتيرى. أى أن الكرموسوم البكتيرى يتكاثر وأيضا يتكاثر مع الفاج المعتدل. ولو لأن إنتاج نسل للفاج تأخر فى حالة الخلية ليسوجين ولكن بعد تحسن الظروف البيئية يمكن أن تنتج جزيئات من الفاج كثيرة ونتيجة لإنفجار الخلية البكتيرية، حيث أن الفاج يسبب تحلل البكتريا.

عند نمو وتكاثر الخلايا البكتيرية بنشاط فإن جزيئات الفاج تتكاثر بسرعة كبيرة حتى حد معين وهو أن عدد جزيئات الفاج يكون أكثر من عدد الخلايا البكتيرية ولذلك لا يتوفر للفاج خلايا بكتيرية لتصيبها ولذلك لا يتكاثر، وقد يستمر الحال كذلك لعدة سنوات وتكون جزيئات الفاج غير قادرة على التكاثر بل الأكثر من ذلك أنه قد تتواجد فى هذه الفترة عوامل ضارة جدا بالفاج deleterious agents تسبب تحطيم وفساد جزيئات الفاج. كان ذلك بالنسبة للفاج المحلل للخلية البكتيرية lytic ولكن العكس صحيح فى حالة الفاج المعتدل فإن جيناته تظل محفوظة بداخل الخلية ليسوجين إلى مالانهاية. وهكذا يمكن أن تفقد جزيئات الفاج المحلل lytic وتبقى جزيئات الفاج المعتدل داخل الخلية البكتيرية إلى عمر طويل أو إلى مالا نهاية وعند تحسن الظروف البيئية وتوفر الغذاء فى بيئة البكتريا فإن البكتريا تستعيد تكاثرها ومعها الفاج المعتدل. وهكذا فإن الفاج المحلل قد يفنى فى عشيرة بكتيرية ولكن الفاج المعتدل يبقى محفوظ داخل الخلية البكتيرية. ولكن يجب الأخذ فى الإعتبار أنه على العكس تماما من الفاج المعتدل فإن الفاج المحلل يتميز بوجود تراكيب للرأس والذيل ثابتة بدرجة كبيرة جدا.

عملية إدخال البروفاج فى كروموسوم البكتريا

Prophage insertion of *E. Coil* phage λ:

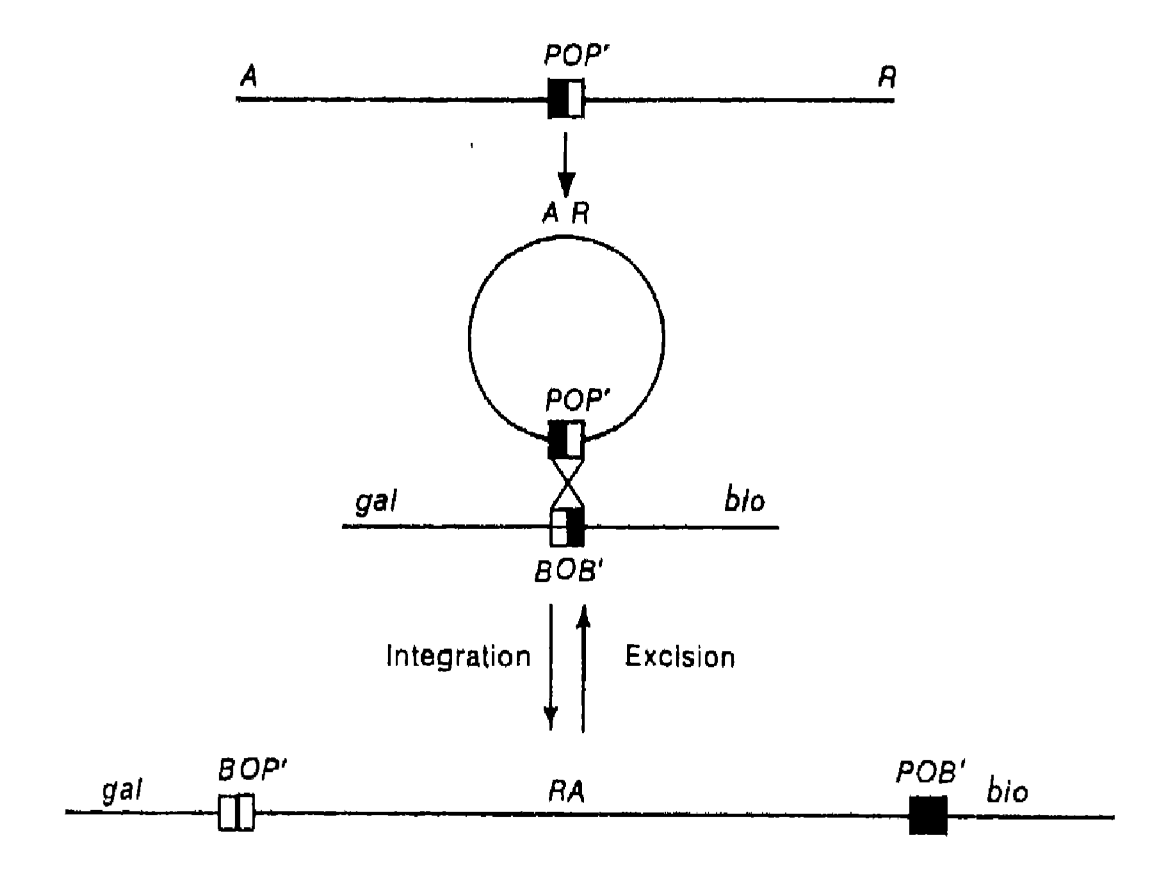
دنا الفاج لامدا يمكن أن تدخل فى موقع معين فى كرموسوم البكتيريا إ. كولاى، وهذا الموقع بين الموقع *gal* والموقع *bio* أى بين جين أو جينات الجالاكتوز *gal* وبين جين أو جينات البيوتين bio، يسمى هذا الموقع الخاص فى هذا الكرموسوم بإسم مكان الإلتصاق لامدا λ attachment site ويتم إعطائه الرمز *att* λ أو *att* L. غالبية الفاجات المعتدلة تدخل فى مكان واحد فقط فى الكرموسوم. هذا التكامل بين الفاج لامدا والكرموسوم البكتيرى integration يحدث نتيجة التزاوج أو الإرتباط أو

الإلتحام recombination بين موقع إلتصاق فى دنا الفاج وبين موقع إلتصاق فى دنا البكتريا. مواقع الإلتصاق لها تتابع قواعد معين واحد ويرمز له بالرمز O وحيث يحدث فيه تبادل للمواقع، يجاور مواقع الإلتصاق تتابع معين أيضا للقواعد خاص بالبكتريا وأيضا خاص بالفاج. موقع إلتصاق الفاج يسمى POP وموقع إلتصاق البكتريا يسمى BOB. طريقة إدخال أو تداخل الفاج مع كرموسوم البكتريا موضحة بالشكل (شكل ١٠). وهى عبارة عن حدوث وتكوين حلقة لدنا الفاج لامدا circularization ثم حدوث كسر طبيعى ثم إعادة إلتصاق الفاج مع دنا العائل ويكون ذلك فى الموقعين O. يتم حدوث التكامل بواسطة نشاط إنزيم integrase إنتيجريز، وهو إنزيم يفرز بواسطة الفاج. وحيث أن موقع الإلتصاق فى كل مرة من البكتريا والفاج ليست واحدة not the same فإنه ينتج عن التوليف بين الأثنين مواقع تسمى مواقع إلتصاق البروفاج prophage attachment sites والتى تعتبر توليف أى تهجين بين مواقع البكتريا BOB ومواقع الفاج POP وهى عبارة عن الموقع POB والموقع BOP. عند تكون البروفاج فإنه يحدث تفاعل فصل excision reaction نتيجة للتوليف بين هذه المواقع، ولذلك فإنه يوجد إنزيم آخر يفرز بواسطة الفاج هو excisionase ووظيفته عملية القطع وفصل البروفاج. كلا من الإدخال insertion والقطع excision عبارة عن توليف أى إعادة صياغة فى أماكن محددة site- specific recombination.

الفاج المعتدل الغير مكمل للكرموسوم البكتيرى

Nonintegrative lysogeny:

غالبية الفاجات المعتدلة تكون تآلف وإتحاد مع الكرموسوم البكتيرى كما تم وصفها فى حالة الفاج لامدا، وحيث أن دنا الفاج يتم إدخاله على موقع خاص على الكرموسوم.



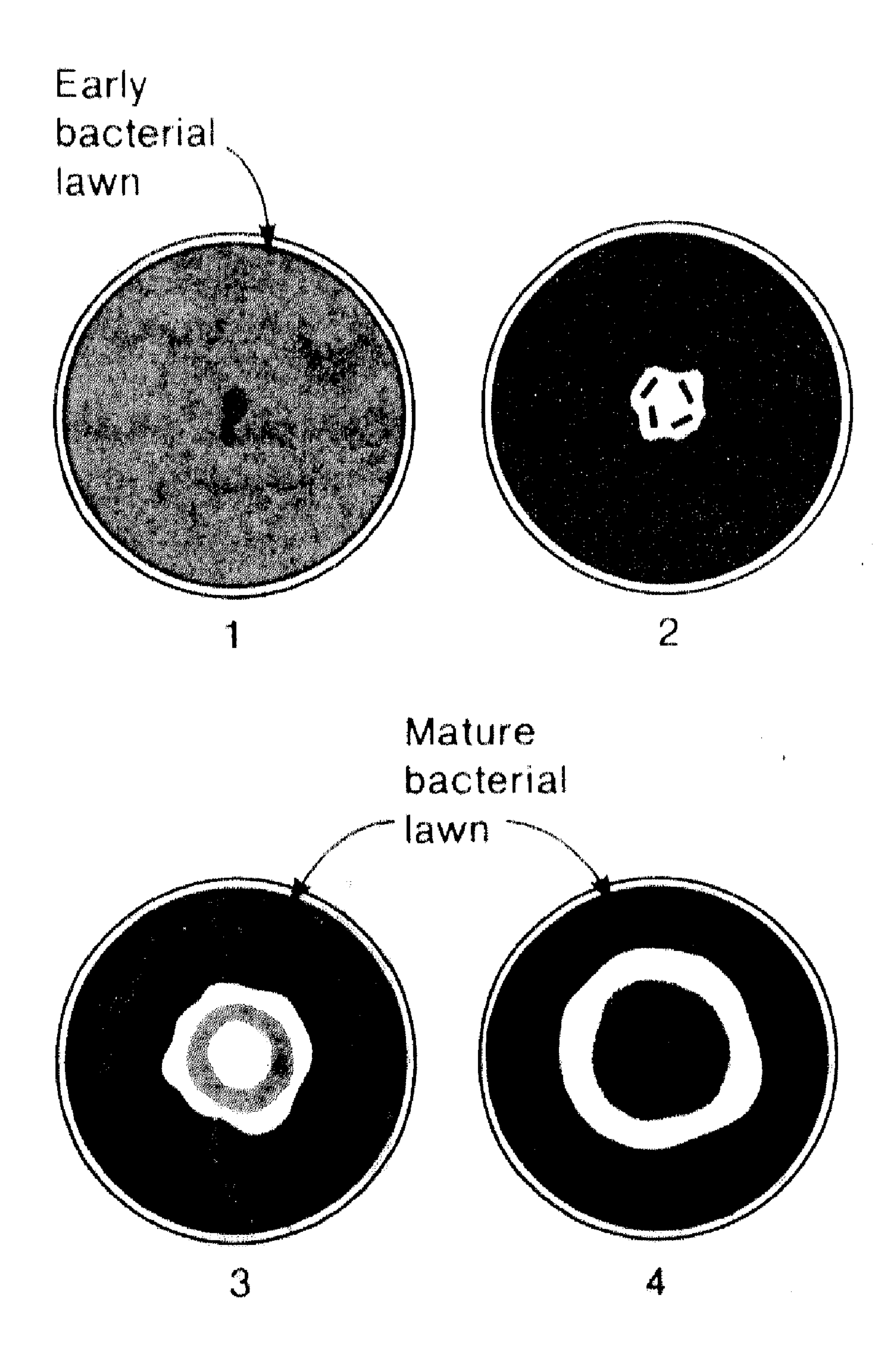
شكل ١٠: آلية وإدخال وفصل الفاج لامدا فى الكرموسوم البكتيرى (أنظر الشـــرح) لاحظ أن البروفاج له موقعين إلتصاق جديدين وهما POB، BOP.

ولكن على العكس من الحالات السابقة فإن الفاج P1 للبكتريا إ. كولاى لا يلتحم مع الكرموسوم البكتيرى. بعد حدوث إصابة البكتريا بهذا الفاج يحدث لدنا الفاج عملية إستدارة أى يكون حلقة كما هو بالحال فى الفاج لامدا. ويوجد على هيئة دنا بلازميدى زائد الحلزنة ويكون جزيئ واحد لخلية البكتريا أو جزيئين. يتكاثر أى يتكرر دنا P1 مع تكاثر الخلية البكتيرية ويصبح فى كل خلية بنوية واحدة جزيئ دنا P1 واحد. يلاحظ أن تكاثر دنا P1 يحدث مع تضاعف أى تكاثر الكرموسوم البكتيرى أى يوجد إزدواج coupling فى حدوث العمليتين. يتحكم فى عملية الإزدواج جين فى الفاج. أما عن أستمرارية maintenance هذا الفاج فى خلايا البكتريا فهى تختلف عنه فى حالة إستمرارية الفاج لامدا. إذ وجد فى هذا الفاج أن كل ألف خلية بكتيرية تفشل خلية بكتيرية واحدة فى إحتواء جزيئ من P1 أى تصبح هذه الخلية خالية

تماما من هذا الفاج. غير معروف السبب فى ذلك ربما يكون للفشل فى عملية التضاعف أى التكرار أى التكاثر أو ربما يكون الإنعزال الغير كامل imperfect segregation للفاج فى الخلايا البنوية.

البقع الرائقة للفاجات المعتدلة Plaques of temperate phages:

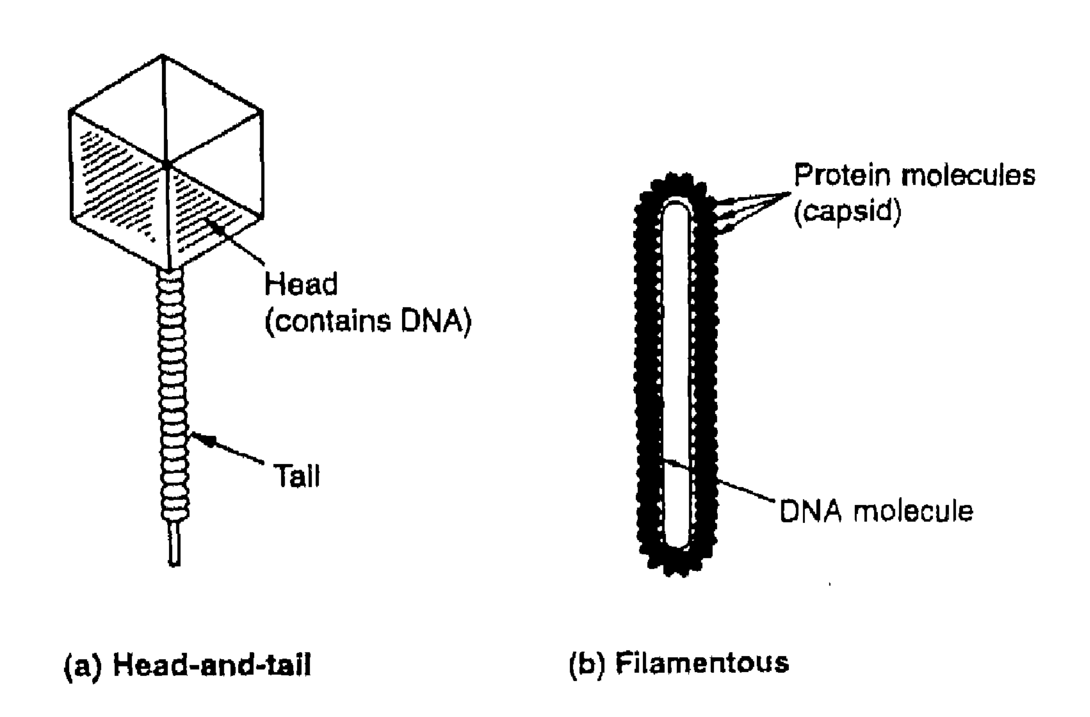
عندما يكون فاج يسبب تحلل الخلايا البكتيرية lytic منطقة رائقة على مسطح من نمو بكتيرى Plaques فإن جميع الخلايا البكتيرية فى مركز المنطقة الرائقة تموت وتتحلل. والعكس صحيح فى حالة الفاجات المعتدلة مثل لامدا تتكون بقع رائقة ذات مركز عكر turbid center. تحدث حالة التعكير نتيجة لنمو الخلايا البكتيرية ليسوجين المنيعة للفاج phage- immune lysogenic cells فى المنطقة الرائقة. عند زراعة الفاج للحصول على المناطق الرائقة فإنه تكون نسبة خلط الفاج مع البكتريا فى الآجار الناعم soft agar هى جزيئ فاج لكل $١٠^{٧}$ خلية بكتيرية. نتيجة ذلك تنمو وتتكاثر خلايا البكتريا بسرعة ويكون MOI منخفض ولذلك فإن دورة التحلل الخاصة بخلايا البكتريا تكون واضحة وتستمر فى الزيادة بتعاقب أجيال البكتريا. وبعد عدد دورات تحلل ناجحة للبكتريا فإن نسبة MOI تصبح عالية وقليل من الخلايا يصبح ليسوجين وأغلب الخلايا يتحلل حيث أن المواد الغذائية فى البيئة لا زالت متوفرة. ولكن بعد ذلك تلى فترة نقص المواد الغذائية فى البيئة وأن خلايا البكتريا المصابة تتوقف عن النمو ويتوقف كبر مساحة البقع الرائقة. والنتيجة النهائية فى هذه الفترة هو عدم إتساع مساحة البقع الرائقة ولكن مع وجود نمو أقل من البكتريا فى داخل المنطقة الرائقة حيث أن المواد الغذائية لا تزال موجودة بهذه المنطقة. ولذلك فإن الخلايا ليسوجين المنيعة للإصابة بالفاج لامدا تستمر فى النمو مكونة مركز عكر فى المنطقة الرائقة turbid center in a plaque (شكل ١١).



شكل ١١: تكوين مركز عكر فى المنطقة الرائقة فى حالة الفاج المعتدل. (١) فاج واحد يصيب مسطح من نمو بكتيرى، (٢) منطقة رائقة صغيرة المساحة (عادة لا يمكن رؤيتها) تحتوى على قليل من خلايا ليسوجين (عبارة عن أربعة خطوط عصوية)، (٣) المنطقة الرائقة تتسع ولكن تنمو خلايا الليسوجين فى المنطقة الرائقة، (٤) أقصى إتساع للمنطقة الرائقة وتتوقف خلايا الليسوجين عن النمو والتكاثر عند نفاذ المواد الغذائية.

ملخص عام للفاج
A Summary Of Phage

البكتريوفاج أو الفاج عبارة عن فيروسات تصيب البكتريا. تركيبها بسيط كما فى الفيروسات الأخرى، فهى تتكون من دنا أو أحيانا من رنا حاملة جينات بعضها خاص بتكاثر الفيرس. يحاط دنا أو رنا بغلاف واق من البروتين يسمى coat أ، capsid (شكل ١٢).



(a) Head-and-tail (b) Filamentous

شكل ١٢: (a) فاج له رأس وذيل،(b) فاج خيطى

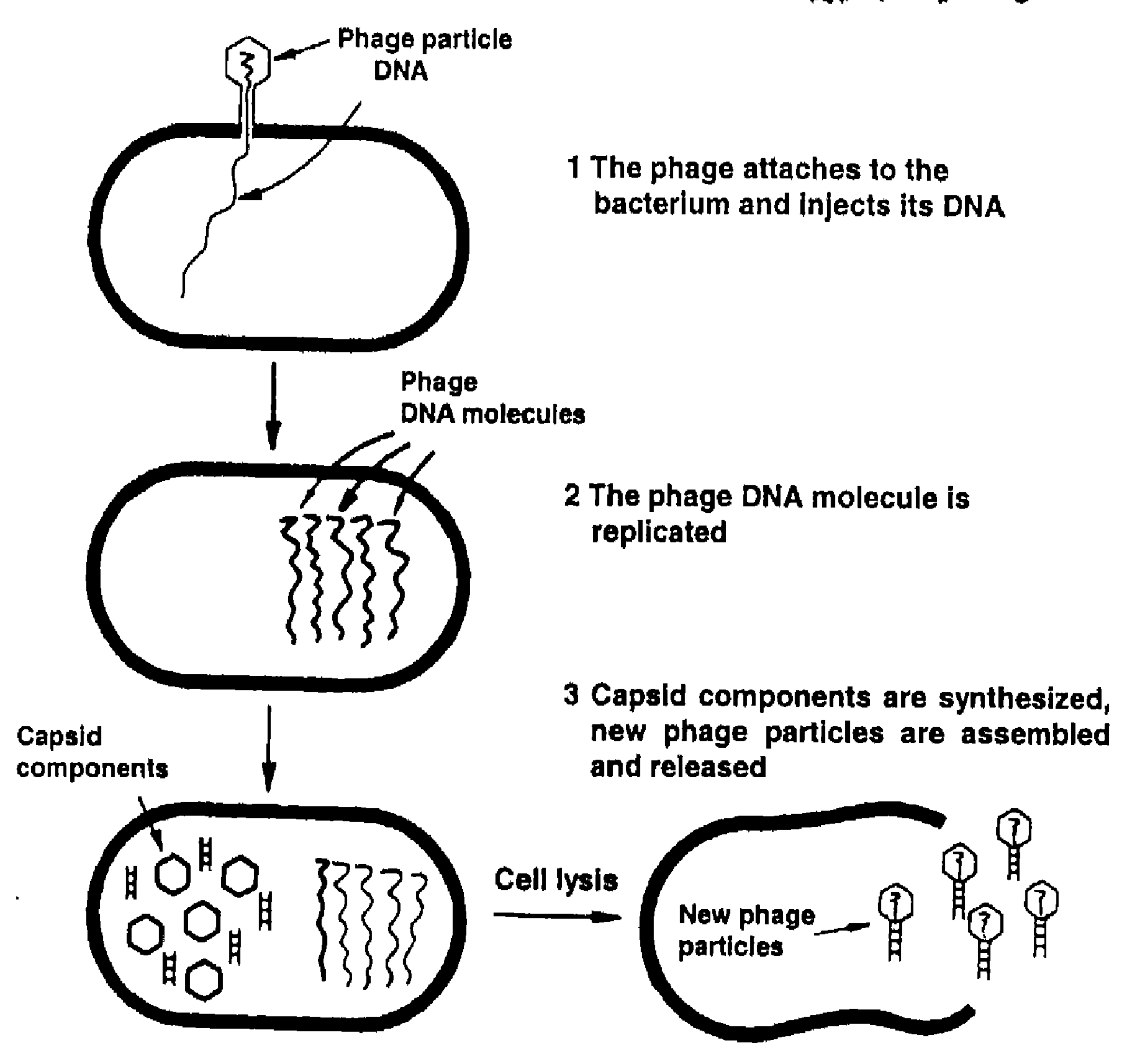
طريقة إصابة الفاج للبكتريا فى جميع الحالات يمكن تلخيصها فيما يلى (شكل ١٣):

١ - إلتصاق جزيئات الفاج بسطح خلية البكتريا وتحقن دنا الخاص بها فى خلية البكتريا.

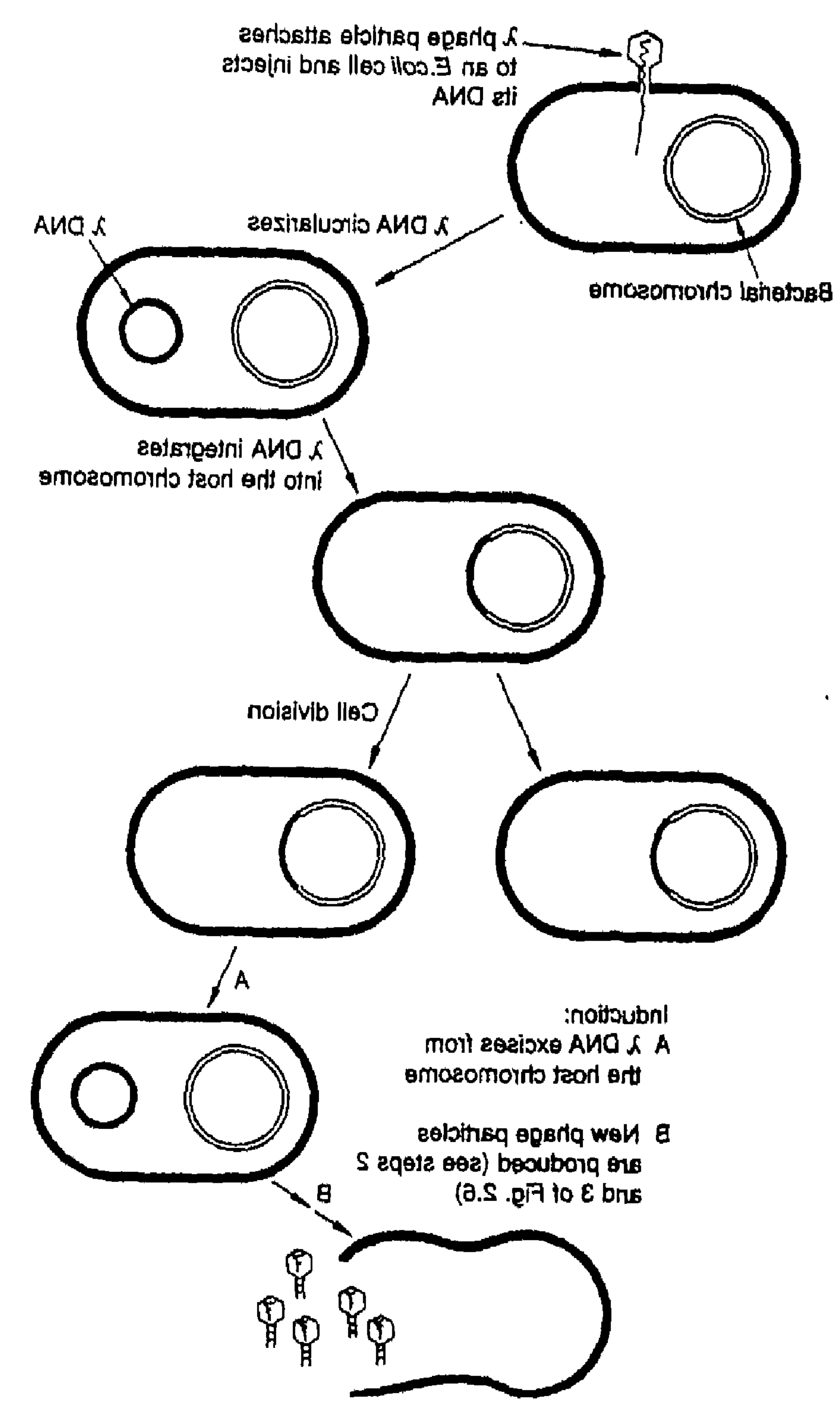
٢ - تكرارية أى تكاثر دنا بإنزيمات معينة تشفر بواسطة الجينات أى مسئول عن تخليقها الجينات الموجودة على دنا الفاج أو كرموسوم الفاج.

٣ - الجينات الأخرى الخاصة بالفاج توجه تخليق البروتينات ليكون هو البروتين الخاص بالغلاف أى الكابسيد. وهكذا يحدث تجمع لدنا والبروتين لتكوين جزيئ الفاج والذى يتحرر من البكتريا بعد تحللها.

فى بعض الفاجات تتم دورة الفاج بسرعة فى أقل من ٢٠ دقيقة، وهذه الحالة من دورة الإصابة السريعة تسمى دورة تحليلية lytic cycle، حيث أن تتحرر جزيئات جديدة من الفاج متعلق بتحلل خلية البكتريا. ومن هذه الدورة يتضح أيضا أن دنا الفاج يخلق أولا ثم يخلق بروتين الفاج ويتكون جزيئ الفاج والذى لا يوجد فى حالة ثبات داخل الخلية البكتيرية.



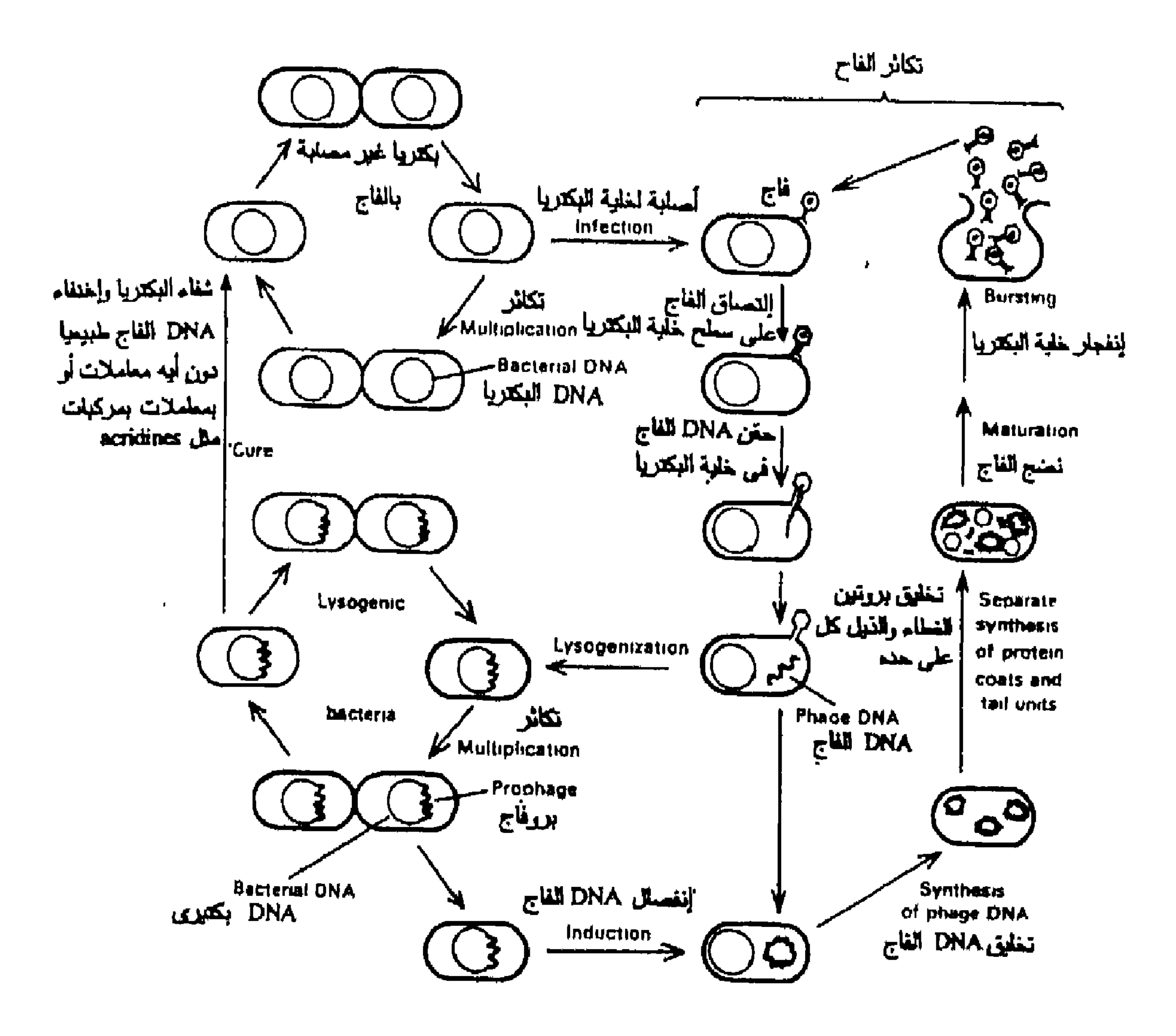
شكل ١٣ : دورة حياة الفاج (المسبب لتحليل خلايا البكتريا lytic mode).



شكل ١٤ : دورة حياة الفاج لامدا وهو فاج معتدل lysogenic.

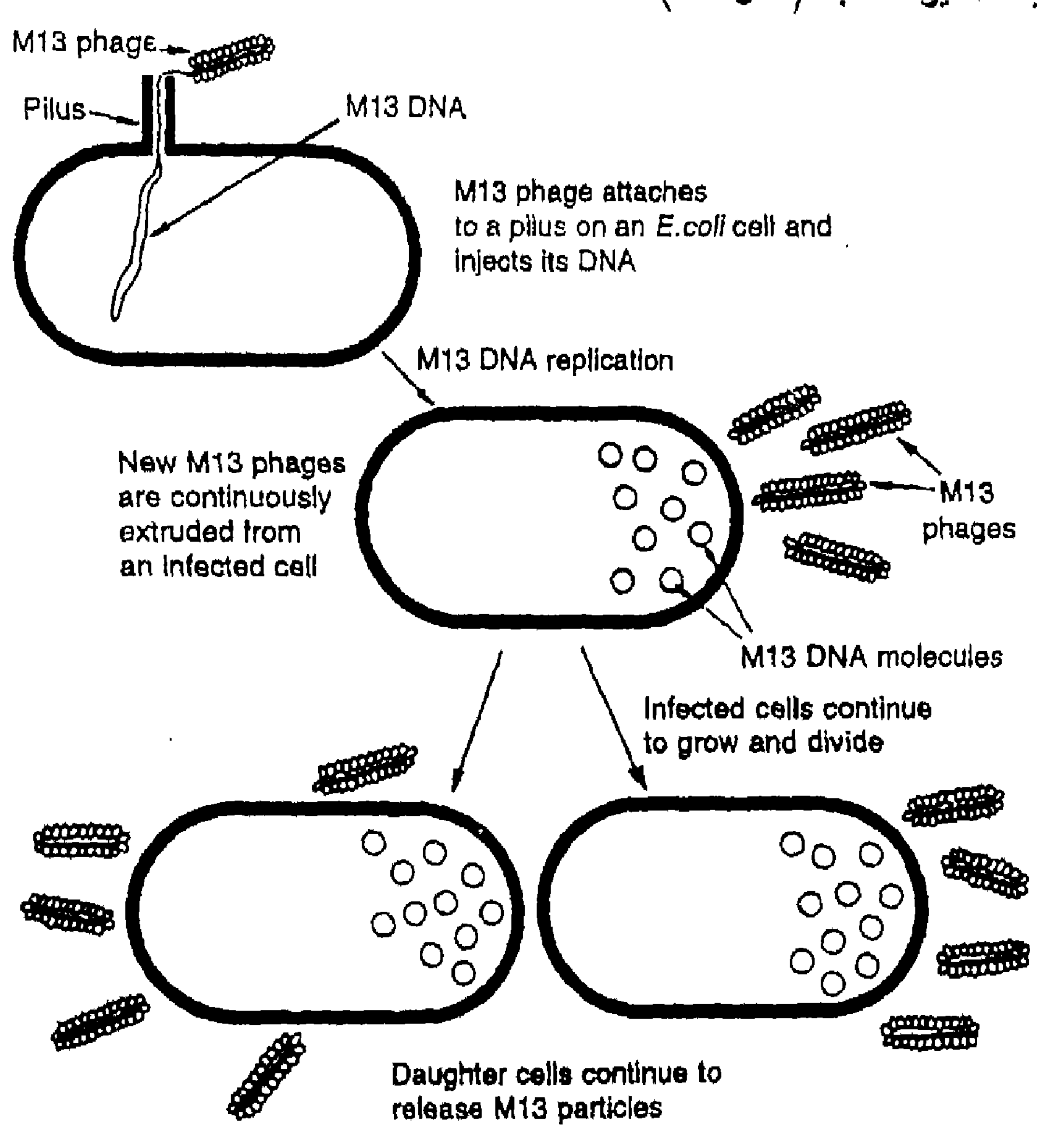
توجد أيضا دورة أخرى للفاج تسمى دورة معتدلة أو هادئة lysogenic cycle وفى هذه الحالة من الإصابة lysogenic infection تتميز بالإحتفاظ بدنا الفاج في خلية البكتريا ويمكن أن يكون ذلك لعديد من الآلاف لإنقسامات الخلية أى تنقسم لآلاف

المرات وهى كذلك. فى كثير من هذه الفاجات فإن دنا الخاص بها يلتحم مع الطاقم الوراثى لخلية البكتريا ويمكن أن تعتبر هذه حالة episome وتسمى episomal insertion يسمى هذا الجزء من دنا المتداخل بإسم البروفاج prophage ويكون ساكن quiescent أما خلية البكتريا والتى تسمى فى هذه الحالة lysogen فإنها تكون متشابهة أى غير متميزة فسيولوجيا عن الخلية البكتيرية الغير مصابة أحيانا (شكل ١٥) يحدث الشفاء من lysogeny إما طبيعيا حيث يختفى دنا الفاج أو بمعاملات صناعية مثل مركبات acridines ولكن فى النهاية يتحرر البروفاج من الطاقم الوراثى لخلية البكتريا ويصبح فاج محلل lytic mode ويسبب تحليل خلية البكتريا.



(شكل ١٥): خطوات تكاثر الفاج و lysogenization والشفاء من lysogeny.

دورة حياة الفاج لامدا وهو يعتبر فاج معتدل مثالى lysogenic phage (شكل ١٤). عدد محدود من الفاجات المعتدلة يكون لها دورة حياة مختلفة. ومثال ذلك الفاج M13 أو الفاجات المتشابهة والتى تصيب البكتريا إ. كولاى فإنه تتكون فاجات باستمرار وتتحرر من خلية البكتريا. دنا الفاج M13 لا يلتحم مع الطاقم الوراثى لخلية البكتريا ولا يصبح ساكن، ولكن مع هذه الفاجات لا يحدث تحلل لخلية البكتريا وأن الخلية المصابة تنمو وتنقسم طبيعيا ولكن بسرعة أقل من الخلايا البكتيرية السليمة الغير مصابة (شكل ١٦).



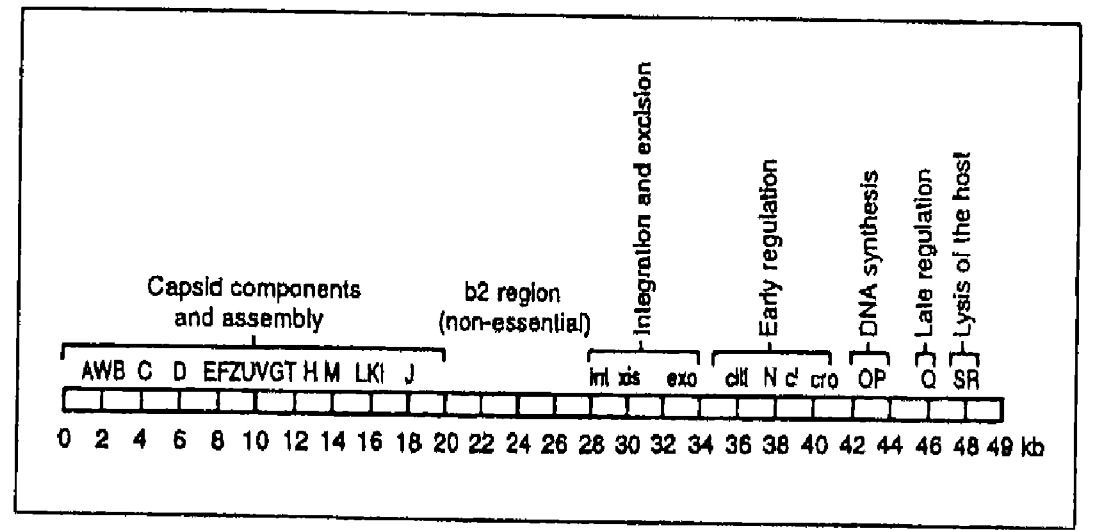
شكل ١٦: دورة حياة الفاج M13

ولو أنه يوجد أنواع من الفاجات فإن الفاج لامدا، M13 يمكن أن يستخدما فى تجارب التوطين كناقلات وسيطة متحركة cloning vectors. وفيما يلى شرح لخواص هذين الفاجين بالتفصيل.

أ - ترتيب الجينات فى دنا الفاج: Gene organization in the λ DNAmolecule

الفاج لامدا تركيب مثالى لفاج ذو رأس وذيل، ودنا موجود بالرأس والذيل لحقن دنا فى خلية البكتريا.

جزيئ دنا الفاج لامدا حجمه ٤٩ كيلو قاعدة وتم دراسته بالتفصيل بواسطة خرائط الجينات gene mapping، وتتابع دنا DNA sequencing. مواقع ووظيفة أغلب الجينات على جزيئ دنا معروفة وثابتة (شكل ١٧). أحد ملامح الخريطة الجينية، هى أن الجينات المتشابهة أى المتقاربة فى وظيفتها تكون متجمعة مع بعضها على الطاقم الوراثى. مثال ذلك، أن الجينات المسئولة عن تخليق الغلاف أى الكابسيد موجودة مع بعضها فى مجموعة فى الثلث الأول من اليسار من جزيئ دنا. والجينات المسئولة عن إلتحام وتكامل البروفاج فى الطاقم الوراثى متجمعة فى وسط الجزيئ. هذا التجمع للجينات هام للتحكم فى تعبير الجينوم أى الطاقم الوراثى وهكذا تسمح للجينات أن تعمل أو تتوقف switched on and off كمجموعة وليست فرادا أى فردية.



شكل ١٧: خريطة وراثية للفاج لامدا توضح الجينات الهامة ووظائف تجمعات الجينات.

هذه الظاهرة هامة فى تخليق وتكوين الناقلات الوسيطة المبنية على الفاج لامدا – λ based cloning vectors.

ب – الأشكال الشريطية والحلقية لدنا لامدا:

The linear and circular forms of λ DNA:

ظاهرة هامة فى تكوين الناقلات الوسيطة المتحركة cloning vectors هى شكل جزيئ دنا. جزيئ دنا الموجود فى الفاج يكون شريطى أى خيطى كما سبق وصفه وله طرفين حرين وهو يوجد كذلك فى رأس الفاج. هذا الشكل الشريطى أى الخيطى للجزيئ دنا يتكون من حلزونين من دنا متكاملين complementry strands of DNA وفيها تزاوج للقواعد base- paired تماما كما فى قاعدة وطسن وكريك Waston- Crick rules (أى أنها ds DNA). وفى طرفى الجزيئ يوجد جزء وحيد الحلزون ss DNA قصير يتكون من ١٢ نيوكليوتيده (شكل ١٨). هذين الطرفين مكملين لبعضهما وهكذا يمكن أن يكملا بعضهما لتكوين جزيئ حلقى يكون ثنائى الحلزون تماما فى جميع أجزاؤه ds DNA. وهكذا توجد الأطراف على هيئة أطراف لزجة sticky ends- cohesive ends. هذه الأطراف اللزجة تسمى مواقع كوس cos sites وهذه المواقع تلعب دورين هامين أثناء دورة الفاج وأثناء الإصابة infection site. وأول دور لهذه المواقع هو تحويل دنا المحقون فى خلية البكتريا والذى يكون شريطى أى خيطى إلى دنا حلقى والتى وهى الخطوة الأولى والهامة والمهيأة لإلتحام هذا الجزيئ فى الطاقم الوراثى لخلية البكتريا. والدور الثانى لهذه المواقع مختلف هو أنه يلعب دور بعد تحرر البروفاج من الطاقم الوراثى فى خلية البكتريا، حيث أنه عند هذه الخطوة فإنه يكون قد تكون عدد كبير من جزيئات دنا الفاج بواسطة آلية معينة لدنا الفاج الحلقى rolling circle mechanism of replication وحيث يحدث فك أى كر مستمر لحلزونى دنا من الشكل الحلقى على هيئة دنا شريطى أى خيطى continuous DNA strand is "rolled off" of the template molecule. نتيجة ذلك يتكون شريط أو خيط من

وحدات متماثلة مرتبطة ببعضها catenane وهذه الوحدات عبارة عن الطاقم الوراثى للفاج أى وحدات من الطاقم الوراثى تكون ملتصقة ببعضها عند الموقع cos وتكون على هيئة شريط. وهذه المواقع co s تعمل كمواقع متخصصة فى أنها قابلة لأن يتعرف عليها أحد إنزيمات endonuclease والذى يفصل كل وحدة catenane عند المواقع cos منتجا فى كل مرة طاقم وراثى للفاج لامدا. وهكذا ينتج عدة أطقم وراثية شريطه مستقلة لها أطراف لزجة. هذا الإنزيم endonuclease يكون ناتج الجين A الموجود فى دنا الفاج، وفى وجود بعض البروتينات فإنه يسبب أيضا تعبئة كل طاقم وراثى للفاج فى رأس الفاج. وكما سنرى فى باب تال فإن فصل وتعبئة دنا يحدث بالتعرف على الوقع cos أى أن هذه الحالات تحدث عند الموقع *cos* وأيضا نتيجة لوجود تتابعات معينة على جانبى الموقع *cos*. والأكثر من ذلك أن تغيير تركيب الأجزاء الأخرى أو الوسطية من الطاقم الوراثى للفاج وذلك بإدخال شظية أو شظيات دنا جديدة لهذا التركيب لا يؤثر على ذلك بشرط أن لا يتغير طول دنا الفاج بدرجة كبيرة أى لا يحدث تأثير حتى لو تغير الطول بدرجة ضعيفة أو متوسطة.

(a) The linear form of the λ DNA molecule

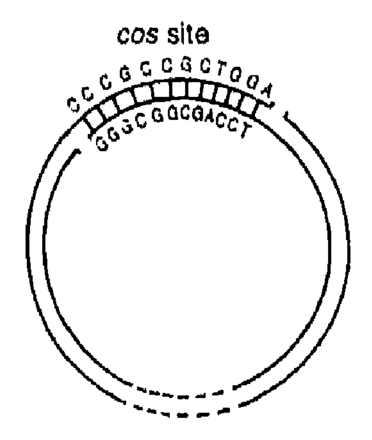
Left cohesive end

Right cohesive end

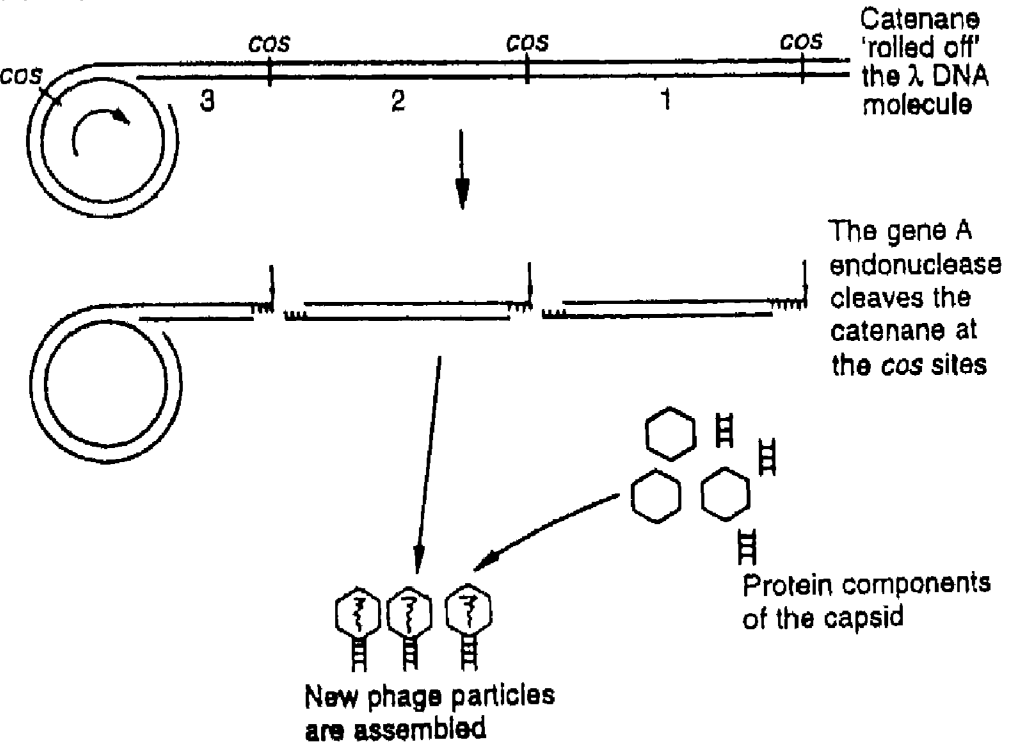
CCCGCCGCTGGA

GGGCGGCGACCT

(b) The circular form of the λ DNA molecule



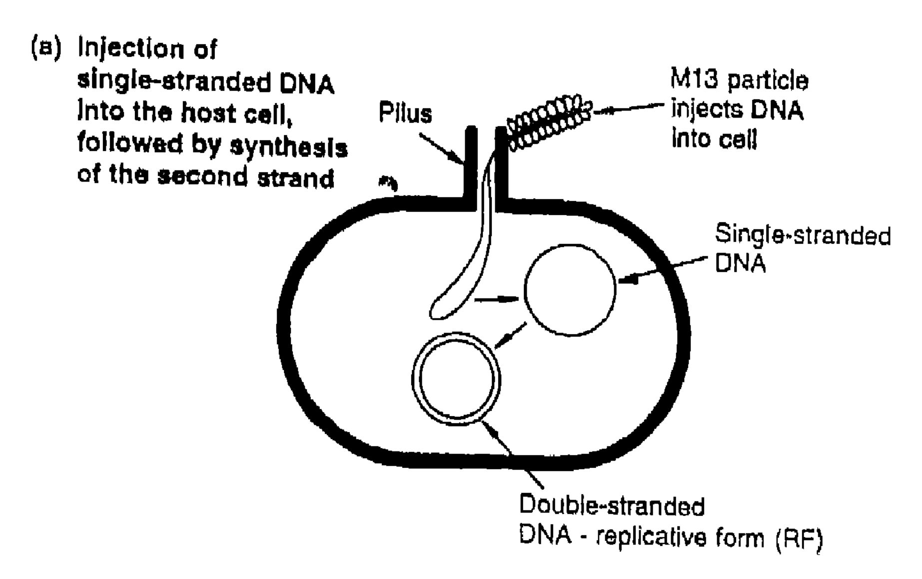
(c) Replication and packaging of λ DNA

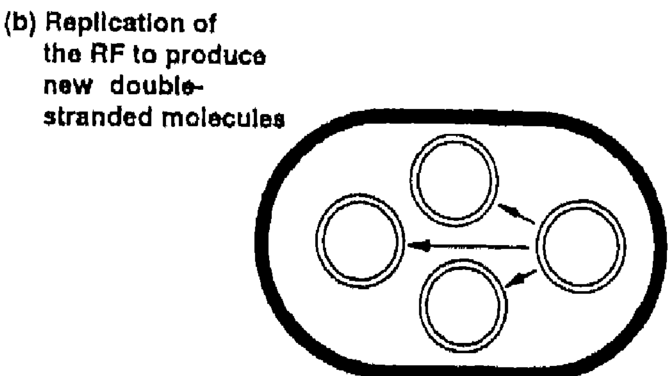


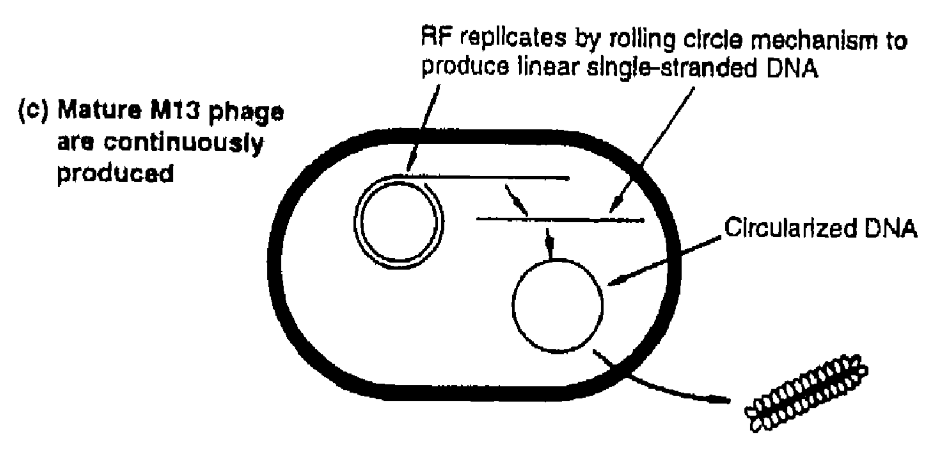
شكل ١٨ : دنا الشريطى والحلقى للفاج لامدا، (a) شكل شريطى لــه أطــراف لزجة، (b) تزاوج القواعد فى الأطراف اللزجة لتكوين شكل حلقى لجزيئ دنــا، (c) كرأى فك شريط دنا من حلقة دنا التى تعمل كمكر rolling circle يســمى هــذا الشريط catenane والذى يتجزأ بواسطة الإنزيم ليكون وحدات من الطاقم الــوراثى للفاج ويتم تعبئتها فى الفاج.

جـ- الفاج الخيطى M13: M13- a filamentous phage

هذا الفاج خيطى (شكل ١٩) ويختلف فى تركيبه عن تركيب الفاج لامدا. دنا هذا الفاج أصغر من دنا الفاج لامدا وتتكون من ٦٤٠٧ نيوكليوتده. وهو فاج حلقى ثنائى الشريط وأحيانا يصبح حلقى وحيد الشريط. صغر حجم الفاج يعنى أنه يحتوى على قليل من الجينات وذلك لأن الغلاف أى الكابسيد يتكون فقط من ثلاثة بروتينات وهكذا يحتاج ثلاثة جينات فقط لهذا الغرض بينما الغلاف فى الفاج لامدا (الغلاف للذيل والرأس) يتكون من أكثر من ١٥ بروتين مختلف. بالإضافة إلى ذلك فإن الفاج له دورة إصابة بسيطة غير معقدة بالقارنة بالفاج لامدا، حيث أنه لا يحتاج جينات لإدخال وتداخل دنا فى دنا خلية البكتريا insertion into host genome. حقن دنا الفاج فى خلية البكتريا يكون عن طريق الهديب pilus. الهديب تركيب يصل بين خليتين متزاوجتين جنسيا أى أثناء التزاوج الجنسى. عند دخول دنا إلى داخل الخلية البكتيرية يكون حلقى وحيد الشريط أو الخيط أو الحلزون ولكن بعد ذلك فإن هذا الجزيئ الحلقى يعتبر كأصل template يتكون منه شريط أى خيط أى حلزون آخر وهكذا يصبح فى النهاية جزيئ حلقى ثنائى الحلزون ds DNA. لا يدخل أو يتداخل هذا الجزيئ فى الطاقم الوراثى البكتيرى أى لا يلتحم معه بل يتضاعف ويتكاثر مرات عديدة لتكوين ما يزيد عن مائة جزيئ فى خلية البكتريا الواحدة. وعند إنقسام الخلية البكتيرية فإن كل خلية بنوية تحتوى على نسخ من الطاقم الوراثى للفاج والتى تتكاثر لتزداد فى العدد وهكذا تحتوى على نفس العدد من النسخ للخلية البكتيرية الواحدة. وعند تكوين وتجمع جزيئات الفاج بداخل خلية البكتريا فإن هذا الدنا الحلقى ثنائى الحلزون يكر أن يفك ليكون شريط أحادى الحلزون ss DNA وهذا الشريط يلتحم طرفيه ليصبح جزيئ حلقى ثم يحدث تجمع لهذا الجزيئ مع البروتين بداخل خلية البكتريا ويتكون جزيئ الفاج الكامل والذى يتحرر من الخلية البكتيرية. عادة يتكون فى كل جيل لكل خلية بكتيرية واحدة حوالى ألف جزيئ فاج جديد.







شكل ١٩ : دورة إصابة الفاج M13. (a) بعد الإصابة يتكون جزيئ دنا حلقـــى وحيد الحلزون ثم يصبح ثنائى الحلزون، (b) دنا الحلقى ثنائى الحلزون يتكاثر ليزداد فى العدد فى داخل الخلية البكتيرية، (c) يكون جزيئ أى جزيئات حلقية من فـــك أى كر حلقة دنا ثنائية الحلزون ثم يصبح جزيئ حلقى وحيد الحلزون ثم يتكون الـــبروتين بداخل خلية البكتريا ويتكون جزيئ الفاج والذى يتحرر من خلية البكتريا.

د- أهمية هذا الفاج M13 كناقل وسيط متحرك

The attraction of M13 as a cloning vehicle:

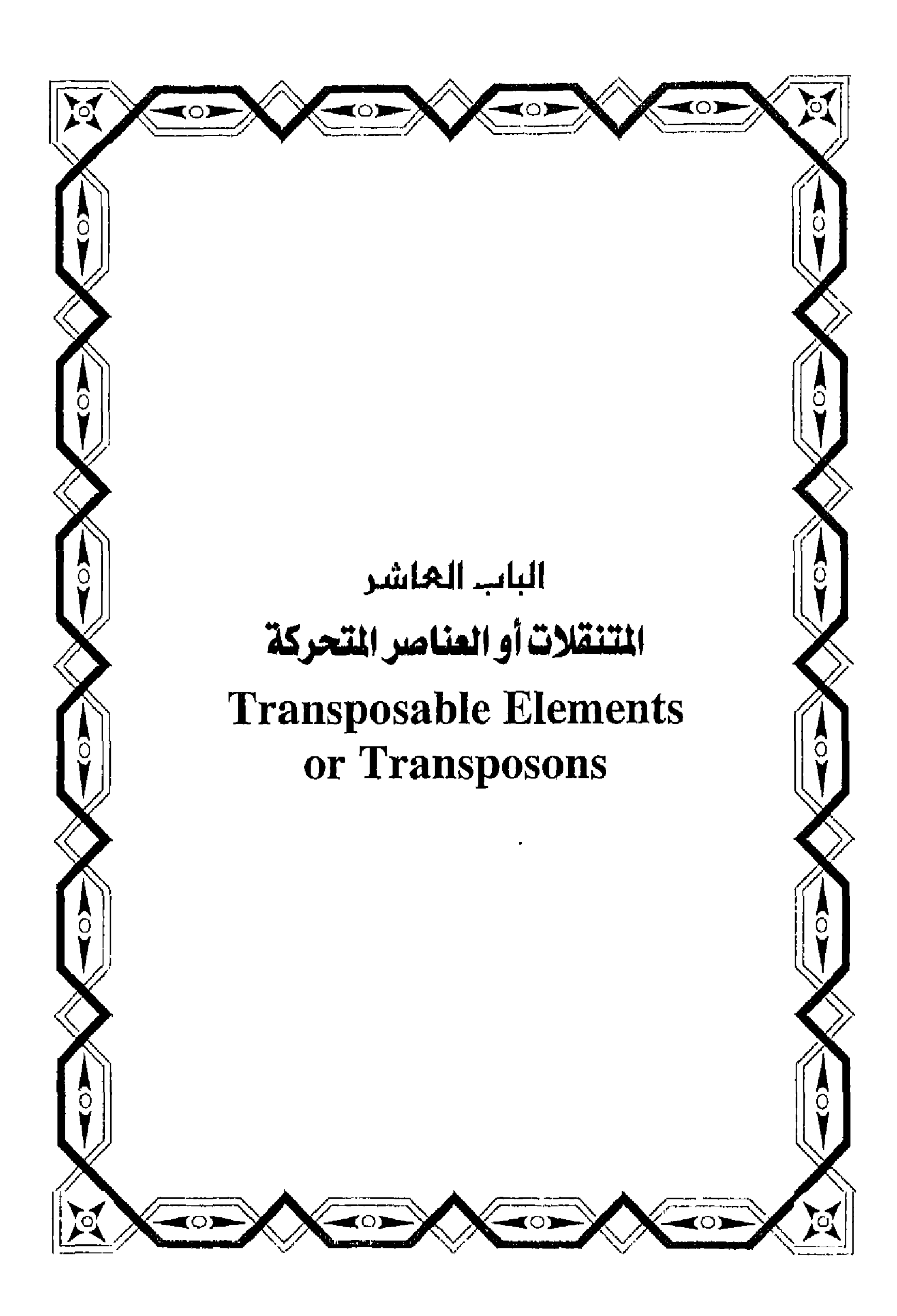
كثير من خواص الفاج M13 تجعله هام كناقل وسيط متحرك. حيث أن الطاقم الوراثى يكون أقل من ١٠ كيلو قاعدة فى الحجم ولذلك فهى صفة مناسبة لأن يكون أن يستخدم هذا الفاج كناقل وسيط. علاوة على ذلك فإن الحلقة ثنائية الحلزون من دنا لهذا الفاج أى replicative form الشكل التكاثرى يكون مماثل أو مشابه البلازميد وهكذا يمكن أن يعامل كذلك فى أثناء التجارب. حيث أنه يمكن تحضيره بسهولة من مزارع البكتريا إ. كولاى المصابة بهذا الفاج ويستخدم بعد إستخلاصه لإدخاله داخل خلية البكتريا مرة أخرى بطريقة transfection. الجينات الموطنة بإستخدام هذا الفاج نتيجة لإستخدامه كناقل وسيط متحرك يمكن الحصول عليها فى صورة دنا وحيد الحلزون ss DNA. وجود الجينات الموطنة على دنا وحيد الحلزون يكون مفيد جدا فى كثير من التجارب والطرق techniques وخاصة تتابع دنا DNA sequencing وعمل الطفرات معمليا صناعيا in vitro mutagenesis.

فى الحالة السابقة يوجد نسخة واحدة من الجين على حلزون واحد فقط وليست على الحلزونين single stranded versions of cloned genes.

إستخدام الفيروسات كناقلات وسيطة متحركة لكائنات حية أخرى: Viruses as cloning vehicles for other organisms

أغلب الكائنات الحية تصاب بالفيروسات ولذلك يمكن أن تستخدم الفيروسات ومنها الفاجات كناقل وسيط متحرك للكائنات الحية الراقية. هذه القاعدة هامة لأن البلازميدات لا توجد إلا فى البكتريا وقليل من الفطريات الخيطية مثل الفطر *Rhizoctonia solani* والفطريات غير الخيطية مثل فطر الخميرة مثل خميرة الخباز. فى الحقيقة تستخدم الفيروسات كناقل وسيط متحرك لخلايا الحيوان بكفاءة عالية. ولكن يمكن أن تستخدم الفيروسات أيضا بكفاءة كناقل وسيط متحرك لخلايا النبات.

فى حالة الفيروسات التى تصيب الحيوان، فإن الفيروسات مثل simian virus 40 (SV40)، adenoviruses، والخاصة بالحشرات baculoviruses قد حازت الإنتباه فى هذا الصدد. ولكن أيضا توجد فيروسات أخرى تم دراستها.



الباب العاشر

المتنقلات أو العناصر المتحركة

Transposable Elements or Transposons

الباب العاشر
المتنقلات أو العناصر المتحركة
Transposable Elements or Transposons

أفترض لوقت طويل عن تكوين وموقع وتركيب الجين وتركيب الكرموسوم أن كل جين له مكان أى موقع محدد غير متغير على كرموسوم معين. هذا الإفتراض تم تدعيمه بمرور السنين وذلك بعمل الخرائط الكرموسومية وذلك بإستخدام كل من الطرق الوراثية والفيزيائية. إعادة الترتيب للجينات بواسطة الإنقلاب inversion والتضاعف duplication أو غيره، على أى حال، يحدث بتكرارية منخفضة فى البكتريا والكائنات حقيقية النواة. فى الأربعينات وعند عمل التحليل الوراثى للتبرقش mottling فى حبوب الذرة إكتشفت ماك كلينتوك Mc Clintock عناصر مسيطرة منظمة regulatory elements والتى تنتقل من مكان إلى آخر وهكذا تؤثر على تعبير الجين عن نفسه gene expression. وبعد ثلاثون عام من عملها السابق تم التعرف على أن البكتريا تحتوى أجزاء أى قطع أى شظايا متحركة mobile segments من دنا والتى تغير من مواقعها لمواقع أخرى وذلك بتكرارية منخفضة. التكرارية للعناصر المتحركة فى البكتريا منخفضة جدا وتحدث بقلة ونفس الشيئ فى حالة الكائنات حقيقية النواة وهى متوقفة على نوع العنصر المتحرك (التكرارية 10^{-7} إلى 10^{-2} لكل جيل) وهكذا فقد أصبح واقع الطاقم الوراثى الثابت static genome غير دقيق وتم إحلاله تدريجيا بحالة الطاقم الوراثى المنساب أى الإنسيابى genome in flux. حركة العناصر المتحركة mobile elements تحتاج إلى تبادل أجزاء من دنا DNA exchange وهى تشابه فى ذلك حالة إعادة الصياغة recombination. ولكن هذه الحالة أى العناصر المتنقلة تختلف عن حالة إعادة الصياغة العادية commonly observed recombination systems حيث أنه فى الحالة الأخيرة يحدث التبادل بين تتابعات دنا متماثلة homologous DNA sequence ولكن فى حالة العناصر المتنقلة

فإن التماثل لا يحتاج إليه لحدوث عملية الإنتقال. فى حالة البكتريا فإن حالة إعادة الصياغة المتماثلة homologous recombination تعتمد دائما على ناتج الجين *rec* A (*rec* A product) أو ما يساويه أو يماثله. على العكس من ذلك، حركة هذه العناصر المتنقلة لا تتأثر بالجين *rec* A حيث أن الإنتقال يحدث بنفس الدرجة والتكرارية فى الخلايا المحتوية على الجين *rec* A^- أو الخلايا المحتوية على الجين *rec* A^+. الحركة المذكورة في هذا الباب تسمى بالإنتقال transposition والقطع أو الأجزاء أو الشظايا المتحركة وتسمى بالعناصر المتحركة transposable elements أو المتنقلات transposons.

معنى وتعريف المتنقل
Transposon Terminology

كثير من المتنقلات البكتيرية تحتوى على جينات يمكن التعرف عليها بسهولة، والتى قد توجد أو قد لا توجد على الطاقم الوراثى genome. مثال ذلك أن الجينات المقاومة للمضادات الحيوية تحمل عادة على المتنقلات. تعتبر المتنقلات الحاملة لجينات المقاومة للمضادات الحيوية أكثر المتنقلات المدروسة بكثرة لأنه يمكن التعرف عليها بواسطة إختبارات أطباق بترى بسيطة simple plating. أغلب المتنقلات المقاومة للمضادات الحيوية يرمز لها أصلا بالرمز Tn ثم يلى ذلك رقم ومثال لذلك Tn5 حيث أن Tn إختصار لكلمة transposon والرقم يميز المتنقلات المختلفة أى المتنقل ١ والمتنقل ٢ والمتنقل ٣ وهكذا. جميع المتنقلات البكتيرية المكتشفة حديثا يرمز لها بالطريقة المذكورة حتى فى حالة عدم الإستدلال على نوع الجين عليها. عندما يكون من الضرورى الإشارة إلى جينات محمولة على المتنقل فإنه يرمز لها بتركيب وراثى قياسى كما يأتى Tn1 (ampr) وفيها ampr توضح أن المتنقل يحمل موقع وراثى للمقاومة للأمبسيللين. أول المتنقلات المكتشفة لا تحتوى على أى جينات للعائل معروفة، ولأسباب تاريخية سميت بتتابعات المتداخلة أو

بتتابعات التداخل insertion sequences أو سميت بعناصر IS (IS elements) ويرمز لها وترقم ISI، IS2، IS3 وهكذا. يمكن أن تسمى المتنقلات أحيانا بطرق غير قياسية ومثال ذلك المتنقل Tn 1000 (عنصر متنقل موجود فى البلازميد F) يسمى عادة جاما دلتا δγ.

يوجد متنقل كثيرا ما يكون موقعه فى جين معين خاص، وهذا يخلق طفرة فى هذا الجين، وهكذا يأخذ رقم أليل allele number. أسم جين ورقم الأليل يتم إتباعهما أى يليهما إثنين كولون أى أربعة نقط (الكولون عبارة عن نقطتين) two colons ثم يلى ذلك إسم المتنقل. مثال ذلك، طفرة ٨٧ فى الجين *lac* Z الناتجة عن المتنقل Tn3 ويرمز لها *lac* Z87 :: Tn3. الجينات المقاومة للمضادات الحيوية الموجودة فى المتنقلات أو الناشئة عن المتنقلات تكون عادة مختلفة تماما عن جينات المقاومة للمضادات الحيوية والتى تنشأ بواسطة طفرة بسيطة للبكتريا الخالية من المتنقلات. فى أغلب الأحيان فإن أصل ومنشأ جينات المتنقلات غير معروف. جينات المقاومة للمضادات الحيوية لأغلب البلازميدات R يتم حملها بالمتنقلات الموجودة فى دنا البلازميد أى أنها تنشأ من المتنقل الموجود فى البلازميد.

تتابعات العناصر الدخيلة المتداخلة
Insertion Elements Sequences

ترجمة insertion elements هى العناصر الدخيلة المتداخلة ولكن للسهولة والإختصار سنعبر عنها بالعناصر المتداخلة. تعتبر العناصر المتداخلة صف خاص من المتنقلات البكتيرية transposons. أول إكتشاف للمتنقلات البكتيرية تم إكتشافه فى البكتريا عام ١٩٦٧. مجموعة من طفرات gal^-، lac^- لها خواص غير معتادة وجدت فى البكتريا إ. كولاى. وتميزت هذه الطفرات بالخواص الآتية:

١ - هذه طفرة قطبية polar mutations بدرجة كبيرة. كل واحدة منها موجودة

فى الخريطة على أول جين للأوبيرون ولكن بروتينات الجينات التالية downstream genes لا يتم تخليقها. مثال ذلك، يمكن أن تكون الطفرة فى الجين *lac* Z، ولذلك لا يحدث إكتمال للمجموعة الجينية complementation does not occur فى البلازميد $F' \ lac \ Z^+ \ lac \ Y^-$ لوجود نقص فى تعبير lac Y من كل من البلازميد والكرموسوم. فى كل حالة تحدث القطبية نتيجة لوجود تتابع نهاية للنسخ أى تتابع خاتمة النسخ. a transcription-termination sequence

٢ - لا يمكن تصحيح هذه الطفرات أى إرجاعها إلى الحالة العادية الطبيعية الغير متطفرة بواسطة مطفرات مثيلات القواعد أو مطفرات تغيير الإطار base-analog or frameshift mutagens.

ولذلك هذا النوع من الطفرات لا يمكن أن يكون عبارة عن إحلال للقواعد base substitutions أو إضافة single- base additions or deletions أو نقص لقاعدة واحدة. (يلاحظ أنه توجد طفرات قطبية أخرى عرفت منذ عام ١٩٦٠ وكانت طفرات إنهاء السلسلة chain- termination mutations والتى سببت نقص فى قدرة الجينات التالية downstream genes على النسخ. وعلى العكس فى هذا النوع من الطفرات فإن المطفرات تزيد من درجة وتعداد إرتداء الطفرات إلى الحالة العادية increased the frequency of reversion of these mutants.

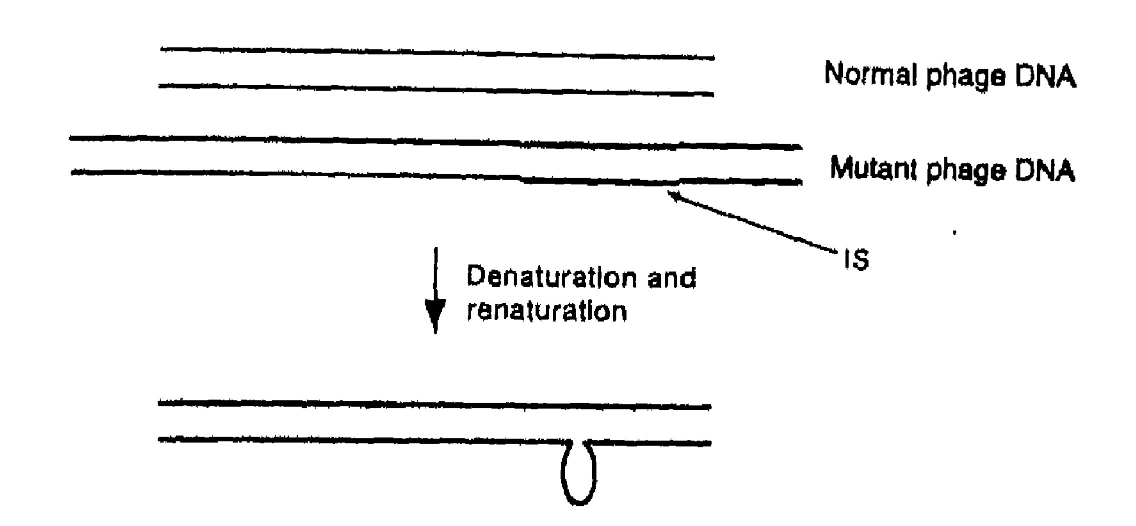
٣ - لو أن بلازميد تم نقله إلى خلية تحتوى على أحد هذه الطفرات القطبية، فإنه تظهر طفرات قطبية مشابهة فى الجينات المحمولة على هذا البلازميد. مواقع الطفرات القطبية على البلازميد وعلى الكروموسوم يمكن أن تكون مختلفة تماما، مثال ذلك، فى حالة الأوبيرون *gal* على الكروموسوم والأوبيرون *lac* على البلازميد. عامة مثال لهذه الحالة ما يأتى:

يتم إنتقال $F' \ lac^+$ بالتزاوج إلى خلية مستقبلة فيها gal^- (قطبى) a gal^- (polar)

وأيضا *lac* Z^- أى أن التركيب *gal*$^-$ *lac* Z^- ولذلك ينتج خلية ناتجة عن التزاوج تركيبها $F' lac^+$ / *lac* Z^- (polar) *gal*$^-$ تنشأ عن ذلك طفرات *lac*$^-$ والتى تظهر نفس الشكل الظاهرى القطبى **the same polar phenotype**. موقع الطفرة على F' وقد أمكن الإستدلال على ذلك بملاحظة أنه عند نقل F' هذا إلى خلية مستقبلة تركيبها F^- *lac* Y^- فإن البلازميد يكون غير قادر على إظهار الشكل الظاهرى (Lac+ phenotype) Lac^+ أى يكون غير قادر على إظهار التركيب Lac^+.

٤ - أثبتت الدراسات الفيزيائية لعديد من البلازميدات المحتوية على هذه الطفرات القطبية فى عديد من الجينات أنه فى كل حالة يكون البلازميد أكبر أى أطول عن البلازميد الأصلى لأن قطعة من دنا تم إدخالها فى الأوبيرون. ولقد تم إفتراض أن هذه الشظايا المتحركة عبارة عن عناصر متحركة **mobile elements** والتى تتحرك من موقع على جزيئ دنا الكروموسومى إلى موقع آخر. عندما تصيب فاجات عديدة مختلفة خلايا تحمل هذه الطفرات القطبية فإنه من النادر أن تجد بعض الفاجات المعزولة تحمل هذه الطفرات القطبية. دنا الفاجات الحاملة لطفرات قطبية تم فحصها بالمجهر الإلكترونى. التهجين بين دنا من فاج حامل للطفرة مع دنا لفاج مشابه خال من الطفرة القطبية ينتج عنه حلقة أى عقدة (شكل ٢٠)، وذلك يثبت أن الطفرة نتيجة إدخال شظية من دنا **an insertion**. طول الشظية الدخيلة المتداخلة هى عبارة عن طول العقدة. فى تجارب أخرى، دنا فاج الطراز البرى تم تهجينه مع دنا تم الحصول عليه من فاجات متطفرة مختلفة وكل منها يحمل عنصر دخيل متداخل **IS** قطبى (مشتقة من سلالة بكتيرية واحدة) فى جينات مختلفة من الفاج. فى هذه التجارب العنصر الدخيل المتداخل له حجم وموقع ثابت والذى يتلاءم مع موقع الطفرة على الخريطة الوراثية. علاوة على ذلك، لو أن فاجات مختلفة الأنواع أصابت نفس السلالة البكتيرية، فإن العقدة لدنا من

طفرة لفاج تحمل عنصر دخيل متداخل IS قطبى يمكن أن تهجن مع الدخيل المتداخل IS الموجود فى أنواع أخرى من الفاج. هذه الملاحظات وضحت أن البكتريا المتطفرة أى الطفرة تعطى نفس التتابع من دنا لجميع الفاجات المختلفة الأنواع التى إكتسبت الطفرة القطبية.



شكل ٢٠ : إختبار التهجين بين فاج طبيعى وفاج بــه دخيــل متــداخل (IS). بعــد renaturation فإن حلزون واحد من كل حدث له تزاوج. لاحظ حالة heteroduplex.

كثير من طفرات الفاج تحتوى جينات من مناطق مختلفة من كروموسوم البكتريا إ. كولاى والتى فيها العنصر المتداخل الدخيل IS element قد تم إدخاله فى التركيب الوراثى للفاج، قد تم مقارنة هذه الطفرات مع البلازميدات المحتوية والحاملة لتتابعات دخيلة متداخلة insertion sequences. التحاليل الخاصة بهذه التجارب أثبتت وجود عديد من عناصر دخيلة متداخلة IS مختلفة، وأن كثير من هذه العناصر تم عزلها من دنا فاج متطفر كما تم التعرف على تتابع القواعد فيها. عدد من الخواص الهامة لهذه العناصر أصبحت واضحة من تحليل تتابع القواعد sequence analyses:

١ - هذه العناصر التى نتج عنها طفرات قطبية تحتوى علامات لوقف النسخ transcription- stop signals (عدا العنصر IS1) وأيضا نتج عنها طفرات إنهاء (ختم) السلسلة chain- termination mutations فى جميع إطارات

القراءة الممكنة all possible reading frames. هذه الخواص كافية لإظهار خواص القطبية.

٢ - نهايات أى طرفى كل عنصر من عناصر IS له تتابع قواعد مكرر مقلوب invereted repeat sequences يتكون من ١٦ إلى ٤١ زوج من القواعد، يعتمد العدد على العنصر (شكل ٢١).

```
——→
________________________________
AGTC                    GACT
ACAG                    CTGA
________________________________
                        ←——
```

شكل ٢١: تتابع قواعد مكرر مقلوب طرفى A terminal inverted repeat in a DNA molecule. توضح الأسهم تتابع القواعد المقلوب، كما يلاحظ أن التتابع المقلوب لا يكون فى نفس الحلزون (الشريط). أما فى حالة التكرار المباشر direct repeat يكون التتابع فى الحلزون العلوى هو AGTC ... AGTC.

٣ - فى كثير من مواقع دخول العنصر الدخيل المتداخل (مثال ذلك، فى حالة أوبيرون إ. كولاى فإن التتابعات يتم إدخالها من اليمين إلى الشمال أو من الشمال إلى اليمين. left- to- right or right- to- lift- orientation

٤ - تم التعرف على عدد نسخ العنصر الدخيل المتداخل فى كل من الكروموسوم والبلازميد (يلاحظ أيضا أن عناصر دخيلة متداخلة عديدة تم فحصها ووجد أنها تحتوى على أعداد مختلفة من القواعد) وذلك بتحضير (تخليق) نسخ مماثلة تماما للعنصر أو العناصر الدخيلة المتداخلة إلا أنها مشعة ثم تم تهجين هذه النسخ المشعة من العنصر الدخيل المتداخل مع denatured دنا لكروموسوم البكتريا إ. كولاى كما تم تهجينها أيضا مع denatured دنا للبلازميد F وذلك لتحديد عدد نسخ العنصر الدخيل المتداخل IS فى الكروموسوم وفى البلازميد F. النتائج مدونة وملخصة فى الجدول (جدول ٣)

جدول ٣: خواص بعض عناصر دخيلة متداخلة للبكتريا إ. كولاى

العنصر	عدد النسخ والموقع	عدد أزواج القواعد
S1	٥-٨ فى الكروموسوم	٧٦٨
IS2	٥ فى الكروموسوم، ١ فى البلازميد F	١٣٢٧
IS3	٥ فى الكروموسوم، ٢ فى البلازميد F	١٢٥٨
IS4	١ أ، ٢ فى الكروموسوم	١٤٢٦
IS5	غير معروف	١١٩٥
Tn 1000 (δγ)	١ أو أكثر في الكروموسوم، ١ في البلازميد F	٥٩٨٠

٥ - تحتوى العناصر الدخيلة المتداخلة على الأقل على أثنين من التتابعات الكودية الواضحة two apparent coding sequences. تبدأ هذه التتابعات بالتركيب AUG وتنتهى هذه التتابعات بواسطة كودون توقف stop codon. بعمل تجارب فى المعمل *in vitro* وبإستخدام أنظمة مخلقة للبروتين protein synthesizing systems مع خلطها مع دنا عنصر دخيل متداخل معزول isolated IS DNA as template ليعمل كأصل، فقد أمكن تخليق البروتين. بعض هذه البروتينات أمكن عزلها من خلايا تحتوى هذه العناصر الدخيلة المتداخلة.

وفى حالة دراسة أعداد كبيرة من المتنقلات البكتيرية، وضحت الدراسة أن كل منها يحتوى الشفرات اللازمة لتخليق نوعين من البروتين على الأقل.

إستقصاء والتعرف على المتنقلات فى البكتريا

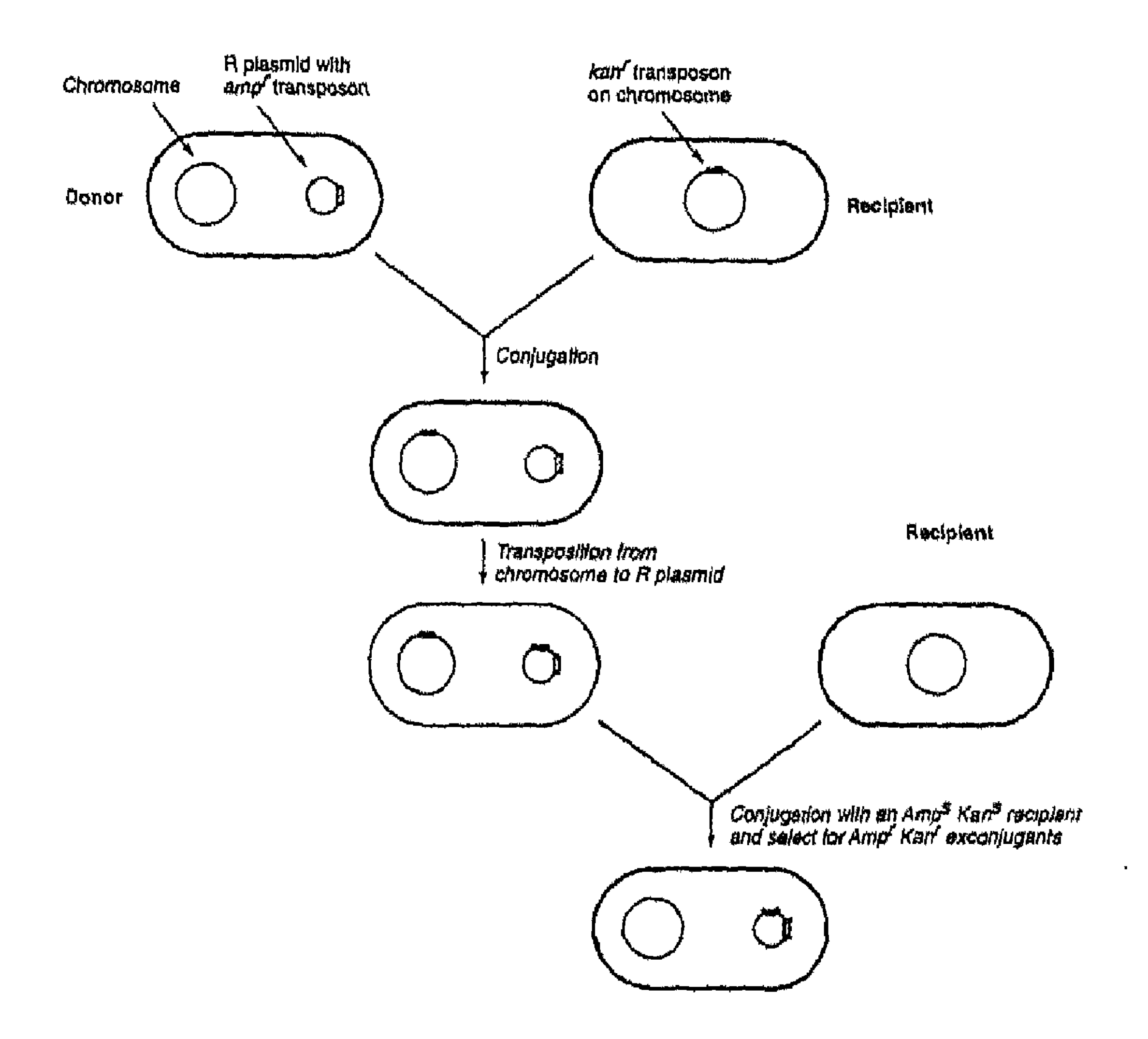
Detection of Transposition in Bacteria

العناصر الدخيلة المتداخلة التى تم وصفها سابقا عبارة عن مجموعة خاصة أو صنف خاص من المتنقلات البكتيرية bacterial transposons. فى هذا الجزء سنفحص ملامح عامة أكثر للمتنقلات البكتيرية وعن كيفية ملاحظتها أى كيفية التنقيب عن وجودها والتعرف عليها.

على النقيض من العناصر الدخيلة المتداخلة IS والتى تم الإحساس بوجودها طبيعيا بواسطة التأثيرات القطبية، فإن المجموعة الأكثر إنتشارا وشيوعا للمتنقلات المحتوية على جينات معروفة ومثال لذلك الجينات المقاومة للمضادات الحيوية والتى لا توجد عادة فى الطاقم الوراثى أى الجينوم genome.

هذه الجينات عبارة عن وسيلة للإحساس بوجود المتنقلات والتعرف عليها، مثال ذلك ما هو موجود فى الشكل (شكل ٢٢).

فى هذه التجربة فإن البلازميد R يحتوى أى يحمل المتنقل Amp^r أى Amp^r transposon والذى يتم نقله بواسطة تزاوج خلية بكتيرية محتوية على هذا البلازميد مع خلية بكتيرية مستقبلة *rec* A^- وهى تحتوى على متنقل بكتيرى Kan^r أى Kan^r transposon أى هذا المتنقل يحتوى جين Kan^r أى جين المقاومة للكاناميسين Kanamycin resistance. عند إستمرارية النمو على البيئة فى وجود هذين المضادين الحيويين فإن الإنتقال يحدث أحيانا ونتيجة لذلك يتكون بلازميد R يحمل كلا الجينين الخاصيين بمقاومة هذين المضادين الحيويين أى المعلمين markers وبالتالى يحمل هذا البلازميد المتنقلين both transposons السابق ذكرهما. يمكن التعرف على وجود هذين المتنقلين على البلازميد بواسطة تزاوج الخلية البكتيرية الحاملة لهذين المتنقلين مع خلية بكتيرية أخرى تركيبها Kan^s Amp^s وزراعة وتنمية ناتج التزاوج على بيئة تحتوى كلا من المضادين الحيويين. فالخلايا التى ستنمو على البيئة بعد التزاوج يكون قد إنتقل إليها جينى المقاوم للمضادات الحيوية. يمكن عمل إختبار آخر علاوة على هذا الإختبار وهو عبارة عن عملية تهجين بين البلازميد المحتوى على المعلمين مع بلازميد عاد خال من المعلمين وفحص الهجين بواسطة المجهر الإلكترونى فيلاحظ تكون عقدة loop كما فى الشكل (شكل ٢٢) ويوضح ذلك وجود دنا دخيل متداخل فى البلازميد.



شكل ٢٢: تجربة توضح الإنتقال. إنتقال المتنقل Kanr من الكروموسوم فى الخلية المستقبلة إلى البلازميد الخاص بالخلية الواهبة بعد تزاوج الخلية الواهبة والمستقبلة.

عند حدوث الإنتقال فإن أغلب المتنقلات يمكن أن تدخل فى مواقع عديدة. إثبات ذلك كان عن طريق عديد من التجارب وفيها يحدث طفرة نتيجة لإدخال متنقل معين. ومثال ذلك، أن مزرعة إ. كولاى هى قابلة للتأثر بالتتراسيكلين Tet^s تم إصابتها بفاج يرمز له $\lambda O^- P^- int^-$ ويحمل المتنقل $Tn10(Tet^r)$، فإن الفاج يكون غير قادر على التكاثر أو حتى التكامل مع الكروموسوم البكتيرى. لذلك فإنه فى الحالة الوحيدة التى يمكن أن تتكون خلايا بكتيريا Tet^r هو بواسطة إنتقال المتنقل Tn10 إلى الكروموسوم. عند زراعة مزرعة البكتريا على بيئة آجار مغذى محتوية تتراسيكلين

فإنه يحدث إنتخاب للمستعمرات البكتيرية الناتجة من الخلايا البكتيرية التى حدث فيها إنتقال. عند فحص عدد كبير من المستعمرات البكتيرية Tet^r وإختبارها (بواسطة replica plating) لإحتياجاتها الغذائية وقدرتها على إستخدام سكريات معينة كمصدر فإنه فى غالبية المتنقلات فإنه لوحظ أن المستعمرة تحمل طفرة فى أى جين مختبر. هذه التجارب توضح أن مواقع تداخل المتنقلات insertions sites فى عملية الإنتقال تكون مبعثرة على كروموسوم إ. كولاى.

بالرغم من وجود عديد من المواقع لإدخال المتنقلات فى كروموسوم البكتريا إ. كولاى وأيضا فى عديد من الفاجات فإن هذه المواقع تكون غير موزعة عشوائيا، عامة بعض المواقع تنثنى من ذلك وتسمى بالمواقع الباردة cold spots والمواقع الأخرى تتبع القاعدة وتتكرر بإستمرار ثابتة وتسمى بالمواقع الساخنة hot spots.

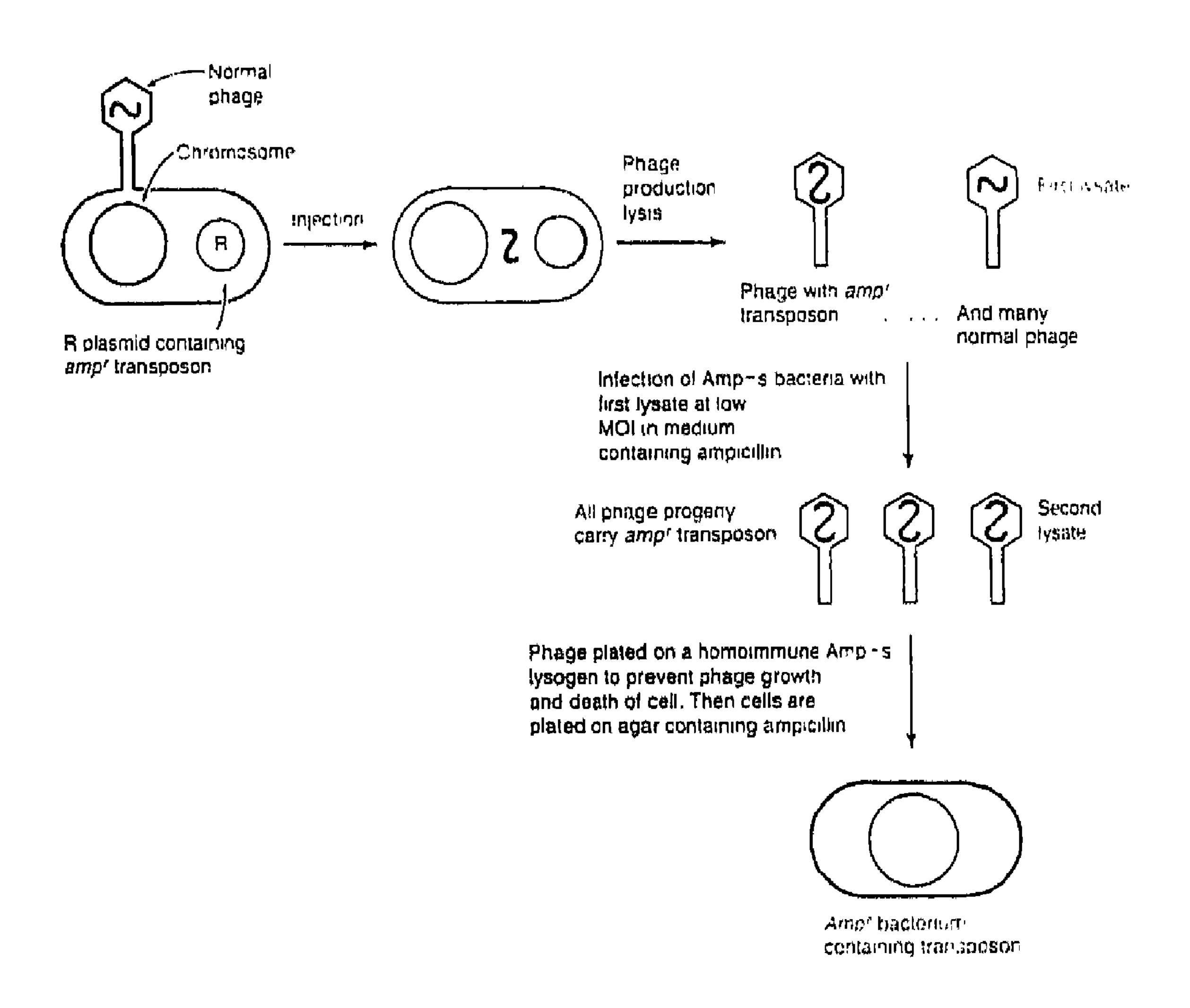
يتم التأكد من ذلك بفحص مواقع التداخل (مواقع الإنتقال) فى مناطق صغيرة فيها تتابع القواعد معروف تماما. وضحت هذه الدراسات أنه يوجد مدى واسع من حيث التخصص فى أماكن التداخل وهى تختلف من متنقل إلى آخر. فى أحد الحالات المتطرفة at one extreme يكون IS4 حيث قد تم عزل ٢٠ طفرة فى الجين galT ذات تداخل مستقل وأتضح أن جميع هذه التداخلات بالضبط فى نفس الموقع من الجين. وعلى النقيض من الحالة السابقة فإن المتداخل Mu يمكن أن يتداخل فى أى موقع. أغلب المتنقلات تظهر تخصص فى موقع التداخل وتقع الدرجة فى هذا التخصص بين الحالتين السابقتين between these two extremes. مثال ذلك، أن مواقع تداخل المتنقل Tn9 فى ١٦٠ أزواج القواعد الأخيرة من الجين *lac Z* أمكن التعرف عليها بواسطة تتابع القواعد، حيث أنه من ٢٨ تداخل مستقل فإن ١٦ موقع مختلف أمكن التعرف عليها ولكن ٥ من هذه المواقع تتميز بتداخلات عديدة أى يحدث فيها التداخل بكثرة أى مرات عديدة. فى حالة المتنقل Tn10 يكون أكثر تخصص فإن

٢٢ موقع مختلف أمكن التعرف عليها فى الأوبرون *his* فى البكتريا Salmonella typhimurium ولكن ٤٠ ٪ من التداخلات حدثت فى موقع نيوكليوتيد مفرد واحد.

يمكن أن يستدل على الإنتقال بطريقة أخرى (شكل ٢٣). فى هذه الحالة فإن الفاج المعتدل لامدا λ يكتسب جين Amp^r من الخلية -*rec* A المحتوية على بلازميد R يحمل Amp^r plasmid- Amp^r، وحيث أن الجين Amp^r يحمل على متنقل وهكذا ينقل الفاج المتنقل إلى خلية أخرى. تم إختيار الخلية *rec* A^- لكى لا يحدث فيها أداة صياغة متماثلة eliminate homologous recombination، ثم تم إصابة الخلية بالفاج. وقد وجد فى النسل من الفاج الناتج من هذه الخلية أن عدد قليل من الفاجات (ربما تكون نسبته حالة لكل ١٠^٧) يحمل الجين Amp^r. وأن عشيرة الفاج قد إستعملت لإصابة مزرعة بكتيرية تركيبها Amp^s وكانت النسبة بين الفاج والبكتريا هى حوالى ١ إلى ١٠ وكان ذلك فى بيئة مغذية محتوية على الأمبسيللين. تموت البكتريا الغير مصابة. كما أن البكتريا المصابة بالفاج الخال من الجين Amp^r لا تكون نسل من الفاج لأنها تتحلل مبكرا نتيجة وجود المضاد الحيوى. لو أن الفاج يحمل الجيـــن Amp^r فإن البكتريا تعيش وتنتج نســـل من الفـــاج Amp^r. وهكذا فى وجـــود الأمبسيللين فإن الفاج التى تحمل المتنقل Amp^r هى التى تنمو فقط وهكذا فإن lysate يحتوى على عشيرة متجانسة من الفاج لامدا Amp^r. لإثبات أن الجين Ampr جزء من المتنقل، فإن الفاج لامدا Amp^r يستخدم لإصابة خلية بكتيرية تركيبها *rec* A^- Amp^s (λ) lysogen. ولأن lysogen يكون منيع للإصابة بالفاج لامدا فإن الفاج يكون غير قادر على التكاثر وتعيش البكتريا. وتنقل الخلايا المصابة إلى بيئة آجار مناسبة محتوية أمبسيللين. وجود الفاج Amp^r يساعد البكتريا على النمو ولكن لأن الفاج غير قادر على التكاثر (لوجود مثبط لامدا فى الخلية presence of the λ repressor in the lysogen)، فإنه فى كل إنقسام للخلية البكتيرية فإن خلية بنوية

لا تحتوى على جزيئ لامدا Amp^r وهكذا لا تتكون مستعمرة بكتيرية ولكن الخلية البنوية الأخرى تحتوى لامدا Amp^r وتتكون مستعمرة بكتيرية. ولكن فى قليل من الخلايا البكتيرية فإن الإنتقال يحدث ويكتسب ويحتوى الكروموسوم البكتيرى على المتنقل Amp^r وهكذا فإن جميع النسل الناتج من هذه البكتريا يحمل الجين Amp^r. وهكذا تكوين مستعمرة دليل على حدوث الإنتقال.

لاحظ أن خلايا البكتريا Amp^r يمكن أن تصاب مرة أخرى بفاج عادى لتعطى جيل ثان من الفاج وقليل من هذا الفاج يحتوى المتنقل.



شكل ٢٣ : خلية تثبت الإنتقال إلى كروموسوم البكتريا إ. كولاى

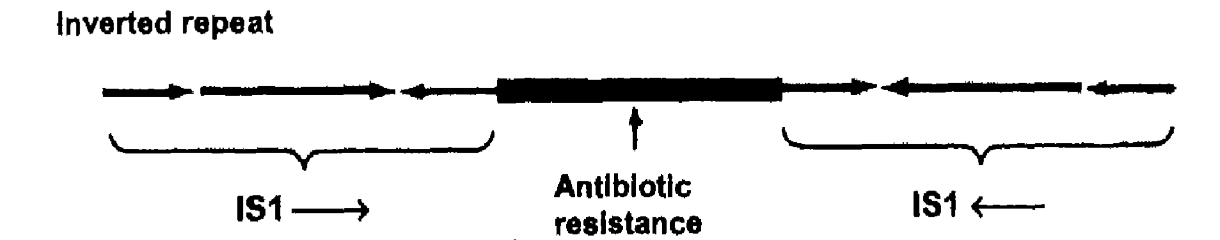
أنواع المتنقلات البكتيرية
Types of Bacterial Transposons

يمكن تصنيف المتنقلات البكتيرية إلى أربعة صفوف 4 classes:

١ - الصف الأول يحتوى IS elements وقد سبق شرحها بالتفصيل.

٢ - الصف الثانى يحتوى المتنقلات المركبة Composite transposons:

عديد من المتنقلات تحمل جينات مقاومة للمضادات الحيوية ويلتصق بكل من طرفيها IS element وهذين الأخيرين يكونان متماثلان تماما أو متماثلان تقريبا. هذا النوع من المتنقلات يطلق عليه المتنقل المركب طراز composite transposons type I، هذه IS elements تكون مقلوبة inverted أو ذات تكرار مباشر direct repeat (شكل ٢٤).





شكل ٢٤: إثنان من المتنقلات المركبة طراز I وفيهـا IS elements مقلوبـة أو ذات تكرار مباشر. الجزء الوسطى يحتوى على الجينات الضرورية لعملية الإنتقال وجينات المقاومة للمضادات الحيوية.

وحيث أن الطرفين فى IS element هما عبارة تكرارين مقلوبين inverted

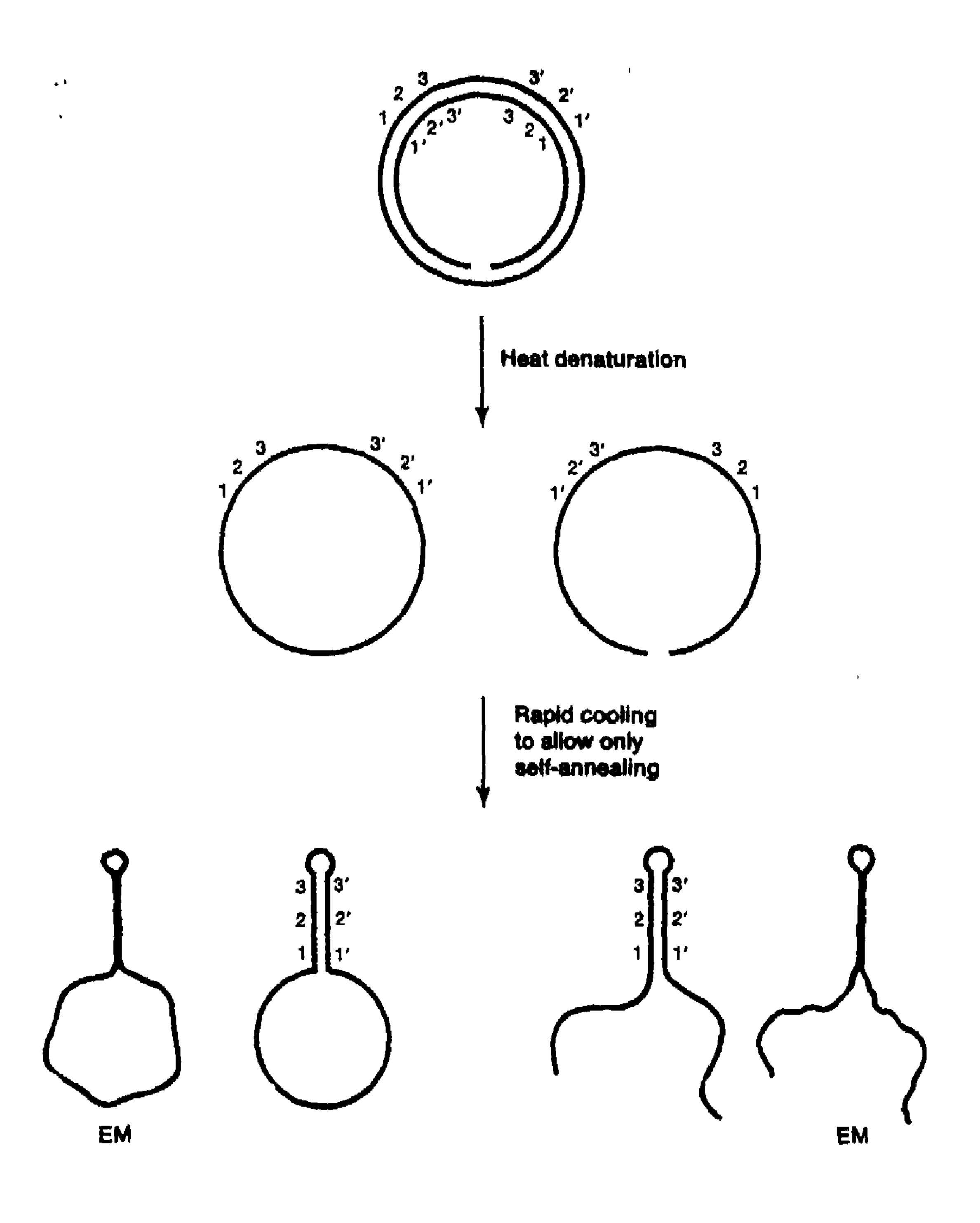
repeats فإن التوجيه النسبى (فى التكرار المقلوب والتكرار المباشر) لكلا من IS elements فى المتنقل المركب لا يغير من تتابع القواعد فى الأطراف، وهكذا يكونان واحد فى التكرار المقلوب. عامة القابلية للإنتقال يحددها IS elements الطرفية. ثلاثة متنقلات مركبة درست بكثرة وهى Tn5، Tn9، Tn10. بعض خواص هذه المتنقلات وأخرى غيرها موضحة فى الجدول (جدول ٤).

Cam إختصار chloramphenicol، ent إختصار enterotoxin، fus إختصار fusidic acid، Kan إختصار kananycin، tet إختصار tetracycline.

Properties of selected composite type I transposons of *E. Coil*

Element	Genes carried*	Size in base pairs	Terminal IS element and size in base pairs	Relative directions of terminal IS Elements
Tn5	kan	5818	IS*50* (1533)	Inverted
Tn9	cam	2638	IS *1* (768)	Direct
Tn10	tet	9300	IS*10* (1329)	Inverted
Tn204	cam, fus	2457	IS *1* (768)	Direct
Tn903	kan	3094	IS*903* (1057)	Inverted
Tn1681	ent	2088	IS *1* (768)	Inverted

* *cam*, chloramphenicol; *ent*, enterotoxin; *fus*, fusidic acid; *kan*, kanamycin; *tet*, tetracycline.



شكل ٢٥: تكوين الأشكال أو التراكيب الساق والعقدة وذلك بواسطة الدنترة denaturation ثم annealing وذلك يمكن رؤيتها بالمجهر الإلكترونى والتى تثبت حدوث التكرار المقلوب. (الخط الرفيع ssDNA والخط السميك dsDNA).

جدول ٤ : خواص متنقل مركب طراز I لمتنقلات إ. كولاى

العنصر	الجينات المحمولة	الحجم مقدرا بأزواج القواعد	العنصر IS الطرفي والحجم مقدرا بأزواج القواعد	الإتجاه النسبي للعناصر IS الطرفية
Tn5	kan	٥٨١٨	IS50(١٥٣٣)	مقلوب
Tn9	*cam*	٢٦٣٨	IS1 (٧٦٨)	مباشر
Tn10	*tet*	٩٣٠٠	IS10 (١٣٢٩)	مقلوب
Tn204	*cam, fus*	٢٤٥٧	IS1 (٧٦٨)	مباشر
Tn903	*kan*	٣٠٩٤	IS903 (١٠٥٧)	مقلوب
Tn1681	*ent*	٢٠٨٨	IS1 (٧٦٨)	مقلوب

أغلب المتنقلات المركبة طراز I تم التعرف على وجودها على أنها عبارة عن عناصر وراثية والتى يمكن أن تنتقل وتتداخل من بلازميد إلى آخر أو إلى الفاج. عندما يكون دنا بعض هذه البلازميدات قد دنتر denatured ثم أعيد إلى الحالة العادية مرة أخرى أى عكس الدنترة renatured فإن حلقات وحيدة الخيط أى الشريط تحتوى تركيب عبارة عن ساق وعقدة stem- and- loop structure قد تم ملاحظتها بالمجهر الإلكترونى. هذا التركيب دليل على حدوث تكرار مقلوب كما هو فى الشكل (شكل ٢٥).

المتنقلات المركبة لها صفتين هامتين:

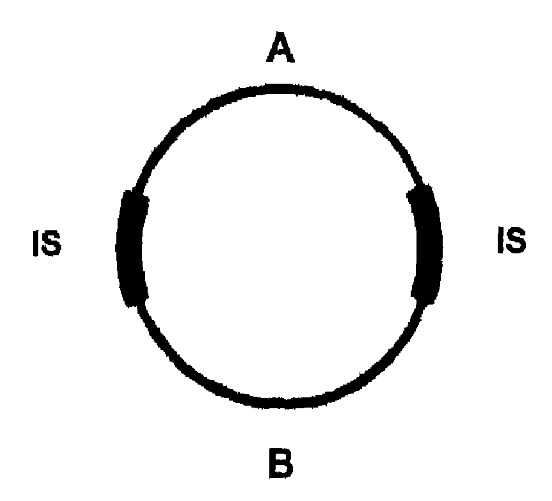
١ - أحياناً عناصر IS الطرفية قادرة على الإنتقال والتداخل مستقلة ذاتيا transpose.

٢ - لكثير من المتنقلات المركبة، لو أن المتنقل يوجد فى بلازميد صغير، فإنها تعمل وتتصرف وكأنها متنقلين مختلفين. وهذا لأن العناصر IS الطرفية والأجزاء من دنا التى تجاورها وأيضا الأجزاء من دنا التى تحيط بها قابلة للإستبدال بين بعضها interchangeable. مثال ذلك، حالة متنقل مركب له

التركيب IS-A-IS، والذى يكون فيه A عبارة عن تتابع للقواعد وسطى. لو أن المتنقل تم إدخاله وتداخله فى بلازميد له تتابع للقواعد يسمى B فإن تركيب البلازميد الناتج عن التداخل يكون كما فى الشكل (شكل ٢٦). لأن البلازميد حلقى فإن كل من A، B يجاورها العناصر IS، وإنتقال لكل من IS-A-IS أو IS-B-IS يمكن أن يحدث، حيث أن كل منهما يصبح كمتنقل وهكذا يوجد متنقلين مختلفين.

٣ - الصف الثالث عائلة المتنقل The Tn3 transposon family Tn3: عائلة المتنقلات Tn3 حوالى ٥٠٠٠ bp أى 5000 bp. الشكل الأولى أى الطراز الأولى prototype أى Tn3، تم التعرف عليه أولا بظهور عنصر متكرر منقلب فى البلازميد R1. كل متنقل يحمل ٣ جينات أحدهما يحتوى ويشفر الأنزيم بيتا لاكتاميز β-lactamase (والذى يسبب مقاومة للأمبسيللين) وإثنان آخران تم إحتياجهما للإنتقال والتداخل (سيتم شرح ذلك فى جزء تال). جميع المتنقلات المتشابهة لـ Tn3 -Tn3- like transposons- تحتوى تكرار منقلب قصير ٣٨ bp -short (38- bp) inverted repeats- ولا يوجد أى منهم يحده العناصر المشابهة لـ IS أى أن هذه الحالة غير موجودة أى أن IS elements غير موجودة.

٤ - الصف الرابع: الفاجات القابلة للإنتقال The transposable phages: إثنان متقاربان من الفاجات أى لهما صلة قرابة، Mu و D108، يعتبر الإنتقال المتداخل transposition كدور رئيسى فى دورة حياتهما: تكرار وتضاعف دنا الفاج يحتاج الإنتقال المتداخل. يتم شرح Mu بتفصيل كبير فى هذا الباب.



شكل ٢٦: إلتصاق متنقل مركب طراز I مع بلازميد صغير B. ينتج عنـــه متـــنقلين مركبين مختلفين.

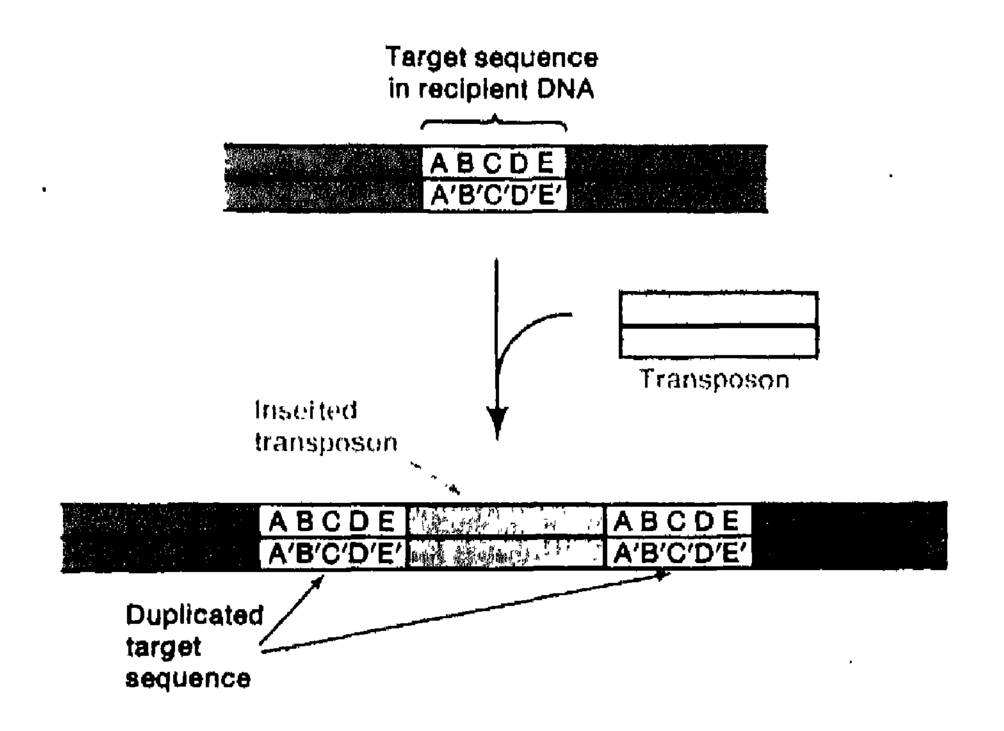
الإنتقال المتداخل
Transposition

النتيجة النهائية لعملية الإنتقال المتداخل هى تداخل المتنقل transposon بين إثنين من أزواج النيوكليوتيــدات فى جــزيئ دنـــا مستقبل. تحليل تتابـــع القواعـــد لكثير من المتنقلات ومواقع تداخلها توضح أنه لا يوجد تماثل فى تتابع القواعد بين المتنقل وموقع التداخل، كما هو متوقع من نقص فى الإحتياج لنظام إ. كولاى *E. coli* *rec* A system – *rec* A. ولذلك، على أى حال، توجد صفات أو ملامح تستحق الذكر عن تتابعات القواعد فى دنا فى المناطق التى فيها المتنقلات قد تم إلتحامها مع دنا المستقبل.

تضاعف تتابع الهدف فى موقع تداخل:
Duplication of a Target Sequence at an Insertion Site:

إدخال المتنقل يكون مصحوب بتضاعف تتابع قواعد قصير ٣-١٢ bp فى جزيئ دنا المستقبل، يسمى هذا بتتابع الهدف target sequence: المتنقل بتداخل كما فى

حالة السندويتش sandwiched بين النيوكليوتيدات المكررة. هذا الترتيب واضح فى الشكل (شكل ٢٧). يلاحظ أن نسخة واحدة فقط من تتابع الهدف موجودة فى دنا المستقبل قبل تداخل هذا المتنقل وهى غير موجودة فى المتنقل ذاته. طول تتابع الهدف يختلف من متنقل إلى التالى ولكنه يكون هو نفسه أو المماثل تماما لجميع التداخلات لمتنقل معين.



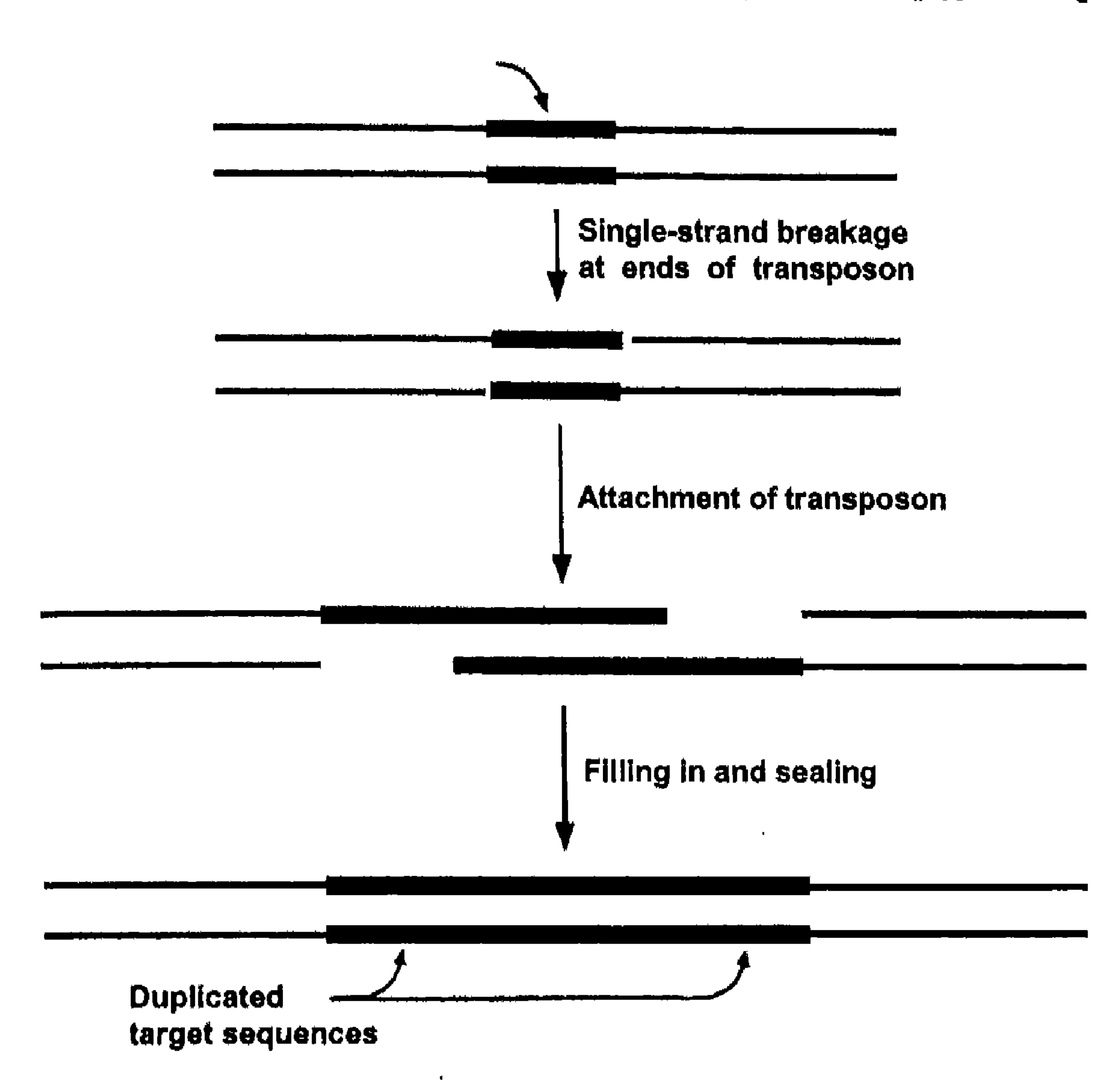
شكل ٢٧: إدخال المتنقل إلى دنا المستقبل يسبب تضـــاعف تتـــابع الهـــدف traget sequence. لا يوجد المتنقل حر.

مثال ذلك، إدخال IS1 يكون دائما مجاور له تتابع q bp - a q-bp sequence- بينما متنقل آخر يكون دائما مجاور له تضاعف لـــ duplication of bpo 5bp-. لاحظ أنه لكل متنقل خاص واحد فإن تتابع الهدف يختلف لكل موقع تداخل مختلف وثابت لموقع التداخل الواحد، ولكن طول الجزء من تتابع القواعد المتضاعف ثابت.

الآلية الأساسية الموضحة فى الشكل (شكل ٢٨) يمكن أن تشرح كيفية تضاعف تتابع الهدف. يوجد إنزيم يسمى transposase (يشفر من المتنقل أى يحتوى المتنقل

على تتابع القواعد الخاص بتكوينه) يعمل على تتابع الهدف فى دنا المستقبل يعمل قطعين أى إنفصالين فى خيطين منفردين two single- strand breaks، واحد فى كل خيط خلف خلاف، عند نهايات الهدف. يتم إلتحام دنا المتنقل إلى النهايات أى الأطراف الحرة الناتجة عن القطع nicks، ولذلك فإن خيط من المتنقل يلتحم بخيط من خيطى تتابع الهدف والخيط الآخر من المتنقل يتم إلتحامه بالخيط الآخر فى الطرف العكسى لتتابع الهدف. يترك هذا الإلتحام فجوتين أى فراغين خلف خلاف، واحدة خلال أو عبر كل خيط الخاص بتتابع الهدف. كل فجوة تملأ بعد ذلك ويتم ربط أى ملأ أو لحم القطوع nicks are sealed، وهكذا فإن الخيطين لدنا المستقبل يصبحا مرة أخرى متصلين ونسختين من تتابع الهدف تجاور المتنقل. لاحظ أنه لم يستعمل أى تجانس أو تماثل عند لصق التتابع الطرفى للمتنقل مع دنا المستقبل.

لأن فى كل وقت يتم إدخال أو دخول المتنقل إلى موقع جديد فإنه يجاور دائما أى يجاوره تتابع هدف مضاعف، ينشأ السؤال: هل التضاعف ضرورى أيضا لإنتقال المتنقل من موقع واهب؟ هذا بالطبع ليس الحال لأن تتابع دنا تم بناؤه (مستعملا طرق إعادة صياغة دنا) وفيها المتنقل لم يجاور مباشرة بواسطة تتابع مكرر repeating sequence. وبالرغم من ذلك فإن المتنقلات تظل قادرة على الإنتقال والتداخل able to transpose.



شكل ٢٨ : كيفية تضاعف تتابع الهدف target sequence.

تركيب المتنقلات وموقع إلتحام الهدف للمتنقل

Structure of Transposons and Transposon-Target- Sequence Joint:

تحليل لتتابع دنا لكثير من المتنقلات تم عمله. حقيقتين هامتين نشأتا من هذا التحليل:

١ - المتنقلات لها نهايات محددة تماما

Transposons have well- defined ends:

تتابعات المتنقل على الطرفين أى النهايتين المقابلتين لتتابعات الهدف متماثلة لكل

تداخل لكل متنقل خاص (شكل ٢٩). كل نوع من المتنقل، على أى حال، له تتابع خاص ولذلك فإن عملية النقل والتداخل تحتاج إلتحام أطراف المتنقل إلى الأطراف الناتجة بواسطة القطع على جوانب تتابع الهدف.

٢ - نهايتى أغلب المتنقلات تحتوى على تتابع مفرد فى حالة صف مكرر مقلوب (بعض الشواذ معروفة).

The two termini of most transposons consist of a single sequence in an inverted repeat array (some exceptions are known)

يمكن توضيح ذلك فى شكل توضيحى (شكل ٢٩). لاحظ أن المتنقل رقم ١، أن التتابع على الطرف الأيسر للخيط العلوى والطرف الأيمن للخيط السفلى هو ١٢٣٤. القراءة فى كل مرة فى الإتجاه ٥١ إلى ٣١. تبعا لنوع المتنقل، عدد القواعد عبارة عن تكرار مقلوب هو ٨ إلى ٣٨ أى تختلف بإختلاف المتنقل. وفى كل متنقل توجد حالتين من التداخل. قدر كبير من الشواهد الوراثية توضح أن أطراف المتنقل ضرورية للإنتقال والتداخل. مثال ذلك، الطفرات فى المتنقلات والتى تنتج تغير فى تركيب زوج قواعد مفرد **single base- pair** مثل نقص صغير **small deletions** وحالات تداخلات صغيرة **small insertions** فى التكرارت المقلوبة **inverted repeat** تمنع الإنتقال والتداخل **transposition**.

الإنتقال المتداخل المتكرر **Replicative Transposition**:

عند إعتبار خلية تحتوى على بلازميدين؛ A و B، أحدهما يحتوى متنقل. فى تعداد أو فى تكرارية حوالى $١٠^{-٧}$ حالة لكل جيل، فإن الظاهرة الموضحة فى الشكل (شكل ٣٠) تحدث. ولذلك، بعد عديد من أجيال النمو يتم إنتاج خلايا تحتوى على بلازميد B (يسمى الآن B^{l}) والذى يحتوى المتنقل الموجود أصلا فى A.

Target sequence

Transposon

Transposon I

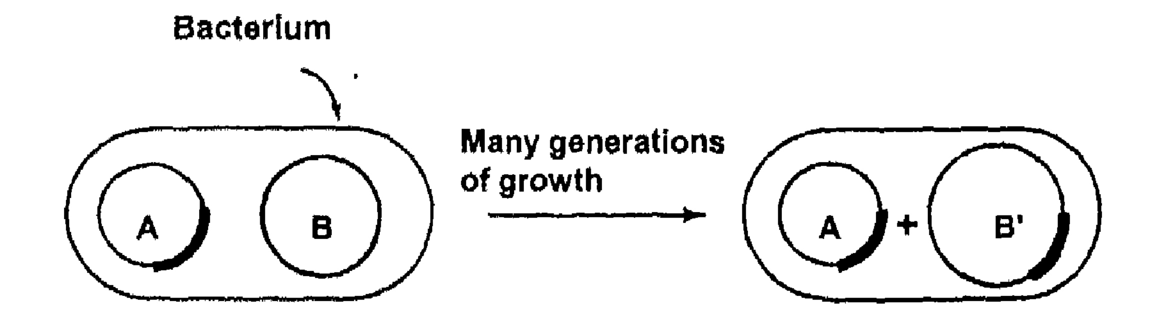
Insertion 1	A B C D E 1 2 3 4 .... 4'3'2'1' A B C D E A'B'C'D'E' 1'2'3'4'............ 4 3 2 1 A'B'C'D'E'
Insertion 2	F G H I J 1 2 3 4 .... 4'3'2'1' F G H I J F'G'H'I' J' 1'2'3'4'............ 4 3 2 1 F'G'H'I' J'

Transposon II

Insertion 3	K L M N O 5 6 7 8 .... 8 7 6 5 K L M N O K'L'M'N'O'5'6'7 8'............ 8 7 6 5 K'L'M'N'O'
Insertion 4	P Q R S T 5 6 7 8 .... 8'7'6 5'P Q R S T P'Q'R'S'T' 5'6'7'8'............ 8 7 6 5 P'Q'R'S'T'

شكل ٢٩: شكل يوضح إدخال المتنقل ١ والمتنقل ٢ فى دنا المستقبل. وفى كل متنقل توجد حالتين من التداخل.

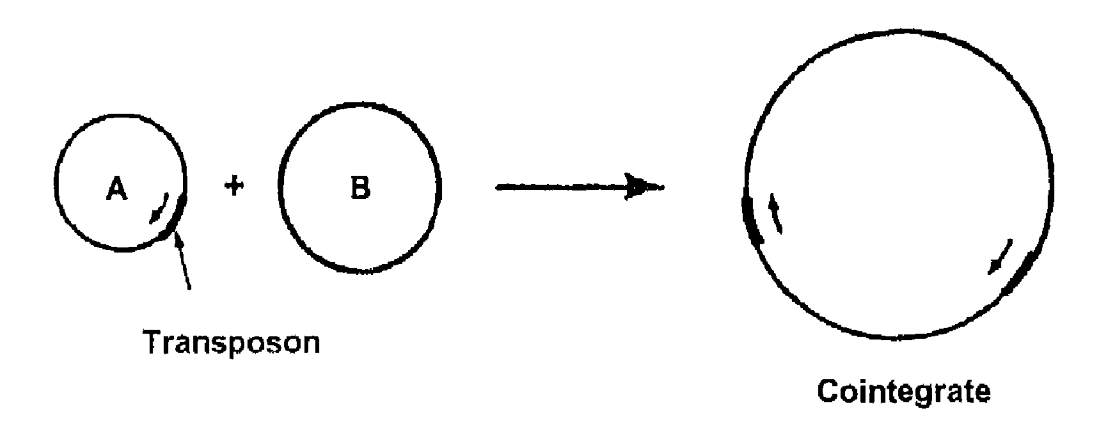
وفى المتنقل الواحد فى الحالتين من التداخل يكون له نفس التركيب من طرفيه أى تتابع القواعد أى أنها ثابتة للمتنقل الواحد. وهذين الطرفين يلتحمان بتتابع الهدف. فى حالة الطرف الأيسر لجميع التداخلات فى المتنقل ١ يكون تتابع القواعد ثابت وهو ١ إلى ٤. نفس الشيئ للمتنقل ٢ يكون تتابع القواعد ثابت وهو ٥ إلى ٨. (كل رقم وكل حرف يمثل قاعدة. والشرطة تعنى قاعدة تكميلية أو مكملة complementary base). ذكر الأرقام لا يعنى أرقام ولكن لتوضيح الشرح فقط.



شكل ٣٠: إنتقال متداخل للمتنقل a من البلازميد A إلى البلازميد B.

مع بعض المتنقلات (مثال ذلك،Tn3 و Mu)، فإن المتنقل يصبح موجود فى كلا البلازميدين. وهكذا، لهذه المتنقلات، فإن تتابع المتنقل الأصلى على ما يبدو يحدث له تضاعف فى أثناء عملية الإنتقال المتداخل transposition process الإنتقال المتداخل لهذه العناصر ليست ببساطة راجع إلى إنفصال العنصر من أحد المواقع وإدخال نفس قطعة دنا إلى الموقع الثانى. وهكذا، الإنتقال المتداخل لهذه المتنقلات عبارة عن عملية تكرارية replicative process. فى حالة المتنقلات الأخرى (مثال ذلك، Tn10 و Tn5)، يكون من الواضح أن التضاعف أى التكرر لا يتم الإحتياج إليه لحدوث الإنتقال والتداخل.

المتنقلات التى تستعمل الإنتقال المتداخل المتكرر replicative transposition لها حالات وسطية وتراكيب وسيطة مميزة فريدة unique intermediate. عند تكرارية أيضا حوالى ١٠^-٧ حالة لكل جيل، فإن بلازميدين يتحدان ليكونا بلازميد مفرد يسمى بلازميد متكامل cointegrate (تسمى هذه العملية أحيانا إمتزاج المتماثلين replicon fusion). هذا البلازميد الهجين لا يكون عبارة عن إمتزاج أو إتحاد بسيط لبلازميد لأنه يحتوى على نسختين (ليست نسخة واحدة) من المتنقل. كلا النسختين تكون لها نفس التوجيه (ولذلك، يكون لها تكرار مباشر direct repeat) وموقعها محدد بدقة وثابت عند الإلتحامات بين تتابعات البلازميد الواهب والمستقبل (شكل ٣١).



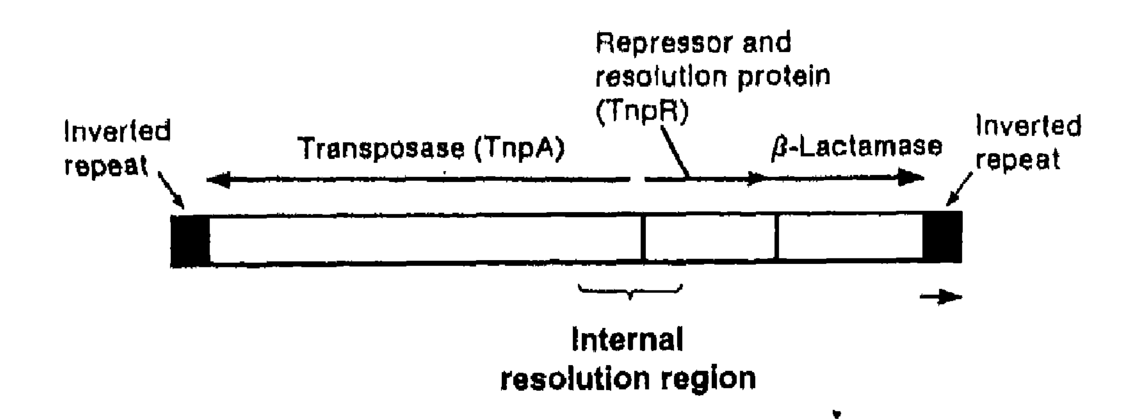
شكل ٣١: تكوين بلازميد متكامل cointegrate من إلتحـام بلازميـدين A، B. تم تكوين نسختين من المتنقل أثناء عملية الإلتحام. توضح الأسهم أن كلا من نسختى المتنقل فى البلازميد المتكامل تكون على هيئة تكرار مباشر direct repeat.

الحقيقة أن البلازميد المتكامل له نسختين من المتنقل، وحيث توجد نسخة واحدة فقط قبل حدوث التكامل لتكوين البلازميد المتكامل (المتكامل cointegration) فذلك دليل على أن المتنقل قد تكرر أى تضاعف. المتنقلات التى تنتقل وتتداخل عن طريق عملية غير تكرارية nonreplicative process لا تكون بلازميدات متكاملة cointegrates.

البلازميد المتكامل وسيط فى عملية الإنتقال المتداخل لـ Tn3 :

Cointegrate as an Intermediate in Transposition of Tn3

تستعمل Tn3 والمتنقلات القريبة الصلة منه الإنتقال المتداخل المتكرر replicative transposition. بعض نتائج التجارب بالمتنقلات فى عائلة Tn3 تقترح تكوين بلازميد متكامل كخطوة وسطية لحالة الإنتقال والتداخل لهذه العناصر.



شكل ٣٢: الخريطة الفيزيائية للمتنقل Tn3. طول المتنقل ٤٩٥٧ bp (زوج قاعـــدة). كلا من التكرار المقلوب الطرفى يتكون من ٣٨ bp.

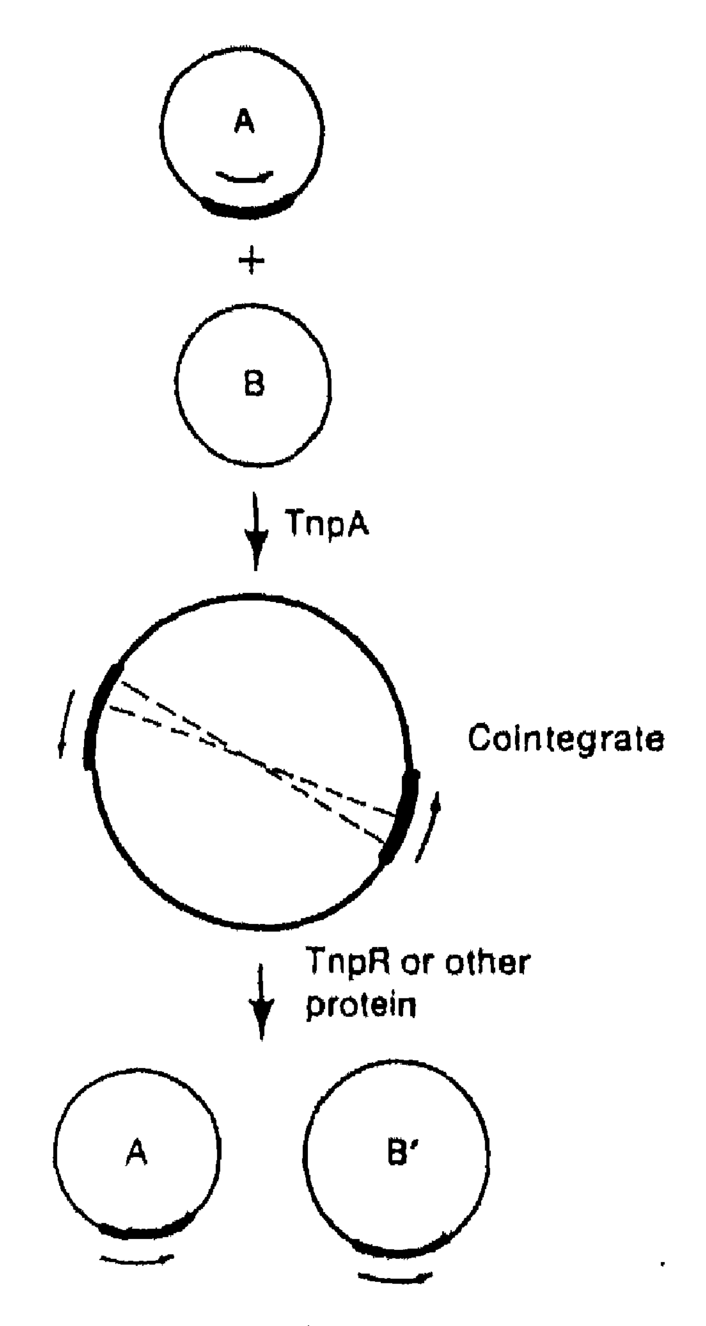
- توجد ثلاثة جينات والأسهم أعلاها توضح إتجاه النسخ.
- لاحظ موقع منطقة الفصل أو التحليل الداخلى بالقرب من حدود الجيـــنين TnpA، TnpR.

تركيب Tn3 واضح فى الشكل. (شكل ٣٢). Tn3 له زوج من تكراريات مقلوبة طرفية والتى تجاور ثلاث جينات. نواتج الثلاث جينات تم عزلها. تبعا لأحجامهم وتبعا

لتتابع القواعد فى Tn3، نحن نعرف أن الجينات تشمل جميع القواعد بين التكراريات المقلوبة. الجين الأكثر تطرف فى جهة الشمال يشفر بروتين كبير الحجم (١٠١٥ حامض أمينى) وهو TnpA ويسمى transposase، وهو مسئول عن تكوين البلازميدات المتكاملة cointegrate. والجين الأكثر تطرف جهة اليمين يشفر إنزيم B- lactamase وهو إنزيم يمنع نشاط الأمبسيلين. الجين الوسطى يشفر بروتين صغير الحجم (١٨٥ حامض أمينى) وهو TnpR ويسمى resolvase وله وظيفتين- كبح تخليق TnpA وتحفيز site- specific exchange موقع متخصص للتبادل والذى يفصل البلازميدات المتكاملة فى الخطوة الثانية من عملية الإنتقال المتداخل. بالقرب من حدود الجينات المشفرة لــ TnpA و TnpR. يوجد تتابع من دنا يسمى موقع الفصل الداخلى internal resolution site أو res، وهى تشمل تتابع للقواعد معين وهذا التتابع هو موقع وعمل وتفاعل TnpR.

الطفرات فى كلا من هذه الجينات تشير إلى دور البروتينات. الطفرات $tnpA^-$ غير قادرة على النقل والتداخل أو حتى على تكوين البلازميدات المتكاملة. وعلى العكس من ذلك تماما، فإن الطفرات $tnpR^-$ ولا حالات النقص فى موقع الفصل الداخلى تؤثر فى القدرة على تكوين بلازميدات متكاملة cointegrates ولكنها تمنع تماما الإنتقال المتداخل transposition. ولذلك فى خلية تحتوى بلازميد ذو نسخة $tnpR^-$ للمتنقل Tn3 وبلازميد ثان ينقصه Tn3 فإن الطريقة الموضحة فى الشكل شكل (شكل ٣١) يمكن أن تحدث ولكن الطريقة الموجودة فى شكل رقم (شكل ٣٠) لا يمكن أن تحدث. هذه الملاحظات تقترح أن Tn3 وسيطة أو سطية فى حالة الإنتقال والتداخل والتى يتم حدوثها بآلية من خطوتين:

أولا: يسبب TnpA تكوين بلازميد متكامل cointegrate ثم ثانيا TnpR يسبب تحفيز site-specific exchange موقع متخصص للتبادل فى موقع الفصل الداخلى internal resolution site. يوجد شكل توضيحى لهذا التتابع من الأحداث (شكل ٣٣).



شكل ٣٣: عملية الإنتقال المتداخل بواسطة تكوين البلازميد المتكامل cointegrate.

بعض المتنقلات خارج العائلة Tn3 لا تحمل شبه أو شبيه TnpR- TnpR like، موقع متخصص لنظام إعادة الصياغة recombination system، ولكنها قادرة على الإنتقال. هذه الأنظمة يمكن أن تستخدم نظام تبادل متجانس غير مستقل -homology dependent exchange لأنه عند تكوين البلازميد المتكامل فإنه يوجد تتابعين متماثلين - نسختين من المتنقل - ولذلك فإن عملية إعادة الصياغة المتماثلة homologous

recombination يمكن أن تقوم بعمل التبادل كما فى الشكل (شكل ٣٣). لأن الإنتقال المتداخل لهذه العناصر، على أى حال، يحدث فى الخلايا *recA*⁻، فإن إنزيم الفصل recombinase للتماثل أو التجانس الغير مستقل homology- dependent recombinase لابد وأن يشفر بواسطة المتنقل. الدليل على أن عملية التجانس أو التماثل الغير مستقل أى المعتمد يمكن أن تحل أى تفصل البلازميد المتكامل تم تعضيدها بملاحظة أن الطفرة للمتنقل Tn3 والتى ينقصها TnpR أو موقع الفصل الداخلى يمكنها أن تقوم بعملية الإنتقال المتداخل (شكل ٣٠) (أى إختزال البلازميد المتكامل إلى بلازميدات منفردة مستقلة) فى خلية العائل $rec\ A^+$.

آلية تضاعف أى تكرار الإنتقال المتداخل

Mechanism of Replicative Transposition:

تمت دراسة آلية تضاعف الإنتقال المتداخل بتركيز كبير فى Mu. أربعة علامات مميزة لتضاعف الإنتقال المتداخل وهى كما يلى:

١ - نسخة من المتنقل تبقى فى الواهب عند موقع بداية المتنقل.

٢ - الوسيط أو الحالة الوسطية هى البلازميد المتكامل cointegrate.

٣ - تتابع قصير متكرر أى مكرر لدنا الهدف target DNA يتم تكوينه على كل جانب من العنصر المتكامل الجديد newly integrated element.

٤ - بعض المتنقلات تحتاج موقع تحليل داخلى internal resolution site أو تبادل متماثل (متجانس) غير مستقل homology- dependent exchange.

توجد خطوتين حرجتين يتم الإحتياج إليهما إنتقال متداخل متكرر replicative transposition:

أ - إلتحام خيطين مع بعضهما (ligated) بدون تزاوج قواعد لتحديد الموقع الذى فيه إثنان من جزيئات دنا قد إلتحمت (نقطة الإلتحام join- point).

ب - شوكة التكرار أى التضاعف يتم نشوئها وتكوينها بحدوث الإلتحام ligation event.

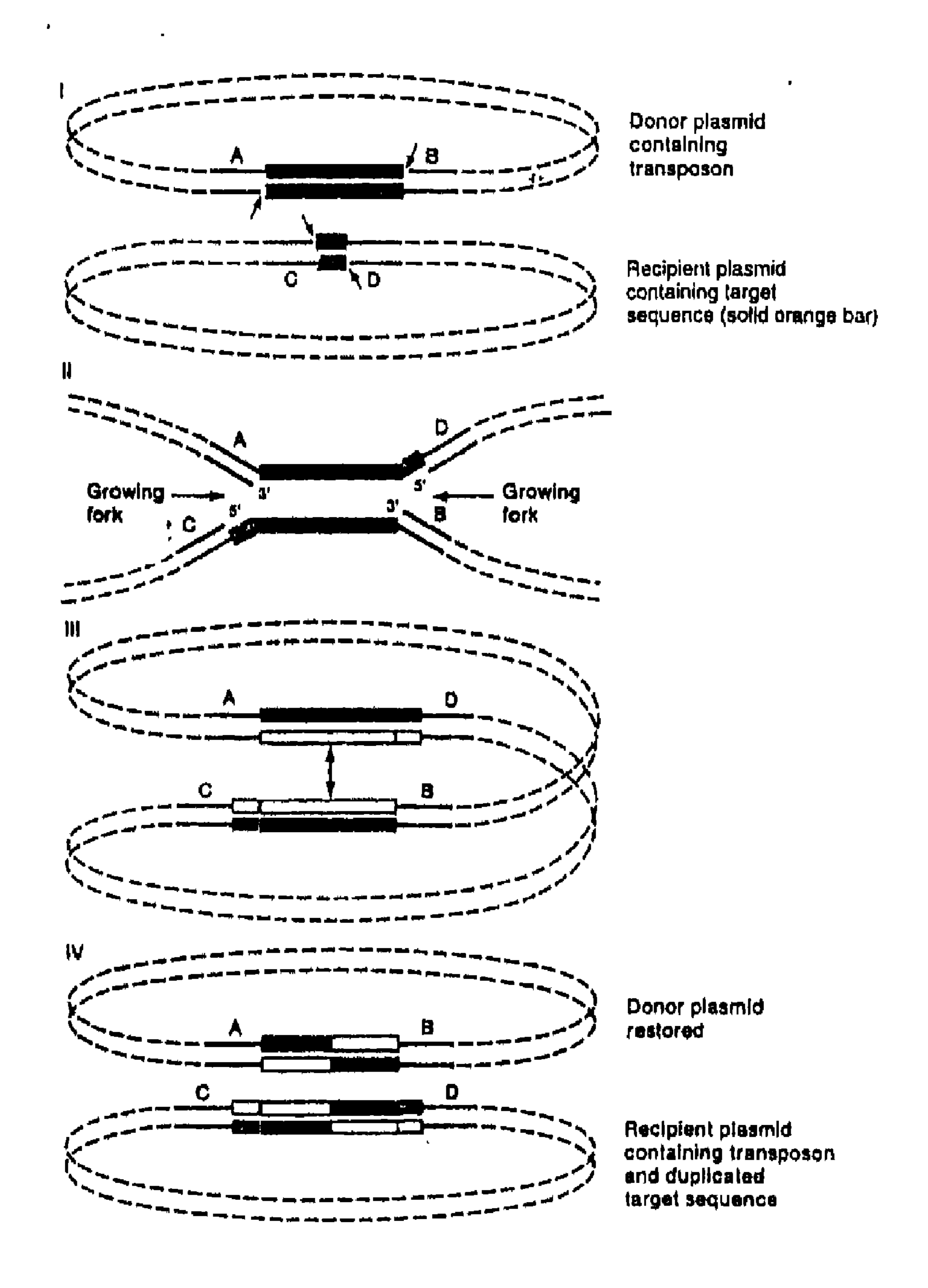
هذه النتائج يمكن شرحها بالموديل الموضح فى الشكل (شكل ٣٤). بإعتبار أن بلازميد واهب يحتوى على متنقل وبلازميد مستقبل. فى المستقبل، يوجد منطقة تتابع للقواعد قصيرة وهى تتابع الهدف، والتى فيها يحدث دخول وتكامل للمتنقل. الخطوات التالية يتم إقتراح ترقيمها كما فى الشكل (شكل ٣٤).

١ - زوج من خيطين مفردين يتم عمل قطع فيهما فى منطقة تتابع الهدف target sequence بواسطة transposase. هذه القطوع تكون غير مستوية staggered، وهكذا، فإن إنشقاق تتابع الهدف ينتج عنه خيطين مفردين مكملين tow complementary single strands

٢ - زوج من الخيط المفرد ينقطع ويتم عمل ذلك فى الخيطين المكملين فى مواقع عكسية أى متضادة على المتنقل، ينتج عن ذلك نهايتين حرتين. كل طرف حر $3^{'}$ يلتحم بواسطة خيط مفرد إلى خيط بارز (والذى يحمل مجموعة $5^{'}$) من القطع الغير منتظم staggered cut فى موقع الهدف، ينتج عن ذلك شوكتين تكرار أى تضاعف two replication forks

٣ - يبدأ التكرار بتخليق خيط تكميلى للطرف البارز لتتابع الهدف. عند إكتمال التكرار يتكون بلازميد تكميلى حاويا نسختين من المتنقل.

٤ - فى النهاية، يحدث تبادل للخيط المزدوج بين نسختى المتنقل. فى حالة Tn3، يحدث هذا التبادل عادة فى موقع الفصل الداخلى. نتيجة التبادل وهو فصل البلازميد المتكامل إلى وحدات واهبة ومستقبلة، كل منها يصبح له نسخة من المتنقل. فى المستقبل، يجاور المتنقل تتابع مكرر مباشر لموقع الهدف، طول هذا التتابع المكرر هو عبارة عن عدد أزواج القواعد بين القطوعات الغير منتظمة staggered cuts.



شكل ٣٤: شكل لتضاعف أى تكرار الإنتقال المتداخل replicative transposition. (١) حدوث قطوعات nicks فى مواقع دنا موضحة بالأسهم، (٢) فصل الخيوط بين القطوعات وربط وإلتحام الخيوط الغير متماثلة. ينتج عن ذلك شوكتين تضاعف أى تكرار replication forks، (٣) تخليق دنا جديد (المستطيلات الفارغة). حدوث تبادل فى خيطين فى موقع متخصص a site- specific strand exchange يحدث بين مواقع الفصل الداخلى internal resolution sites (الأسهم) أو يحدث التبادل بواسطة homology- dependent strand exchange والذى يحدث فى هذه الحالة فى أى موقع من المتنقل، (٤) إنفصال جزيئات دنا عن بعضها.

الإنتقال المتداخل الغير مكرر Nonreplicative Transposition:

بعض المتنقلات الأخرى لا تستعمل إنتقال متداخل مكرر أى متكرر، يحدث الإنتقال المتداخل بآلية محافظة conservative mechanism (قطع وعجن cut and paste) والذى يحتاج تخليق دنا فقط لملأ الفجوات فى النهايات بين المتنقل وتتابع قواعد الهدف (شكل ٣٥).

أكثر الأدلة وضوحها لهذه الآلية هو نتيجة لتجربة Bender وأيضا Kleckner عام ١٩٨٦. حيث أنهما قد تمكنا من تخليق وتكوين وبناء مشتق من Tn10 بواسطة إدخال للجين *lac* Z. ثم تمكنا بعد ذلك من عمل heteroduplex بين نسخة من Tn10 حاملة الجين *lac* Z^+ ونسخة من Tn10 ذات طفرة فى *lac* Z. ثم بعد ذلك فحصوا الشكل الظاهرى *lac* بعد عملية الإنتقال المتداخل للـ heteroduplex للـ Tn10. لو أن الإنتقال المتداخل لـ Tn10 حدث بتكرار شبه محافظ semiconservation replication، على المتنقل، فإن الخلية ستحتوى على نسخة من +lacZ أو -lacZ وليست كلاهما. وعلى العكس من ذلك، لو أن الإنتقال المتداخل حدث بآلية قطع وعجن، فإن الخلية ستحصل على heteroduplex مع النسختين الخاصتين بـ *lac* Z: فى إنقسامات الخلية، أحد الخليتين البنويتين سترث نسخة *lac* Z^+ لـ Tn10 والخلية البنوية الأخرى سترث نسخة *lac* Z^- لـ Tn10. عندما فحصا المستعمرات الناتجة فى أطباق ذات دليل ملون، وجدا أن عديد من المستعمرات لها نفس الشكل الظاهرى المتوقع أى المتكهن به للإنتقال المتداخل الغير متكرر.

شكل ٣٥: شكل يوضح المتداخل الغير متكرر **Nonreplicative transposition**. (A) إنزيم **transposase** يقطع دنا **double stranded cuts** فى كل طرف من طرفى المتنقل فى جزيئ دنا الواهب أما القطع فى المستقبل كان غير متقابل **staggered**. (**staggered single stranded cuts**)، (B) إلتحام المتنقل بالأطراف $5'$ لدنا المستقبل عند موقع الهدف، (C) يتم ملأ الفجوات فى كل شريط مفرد فى كل طرف بواسطة دنا الناتج من نشاط إنزيمات بلمرة دنا **DNA polymerases** الناتجة بواسطة العائل. أما الأطراف الحرة لدنا الواهب يتم تحليلها بواسطة **exonucleases** العائل.

فصل المتنقلات

Excision of Transposons

أحيانا تنفصل المتنقلات من أماكن التداخل أى أماكن تداخلها. يمكن التعرف على الإنفصال بعديد من الطرق. مثال ذلك، كيف يمكن التعرف علي إنفصال Tn5 من *lac* Z::Tn5 (والتى تحمل Kan^r فى الجين *lac* Z) ؟ فى أحد الدراسات، تم عزل ١٩ تداخل. هذه الطفرات المتداخلة كانت ثابتة، أوضحت تجارب الخرائط أن طفرات lac^- و Kan^r مرتبطة بشدة tightly linked. المزارع المشتقة من كل طفرة من الـ ١٩ طفرة تم تحضيرها وإختبارها للإرتداد Lac^+.

Lac^+ reversion. تنشأ المرتدات Lac^+ reversion Lac^+ بتكرارية 10^{-6} لكل جيل وأن ٩٩٪ من المرتدات كانت Kan^s. وهكذا، يرتبط أو متعلق بالشفاء من الشكل الظاهرى Lac^+ الفقد الكامل لـ Tn5 من الخلية- عملية سميت إنفصال بالضبط أو الإنفصال المضبوط. precise excision فى ١٪ من خلايا Lac^+ والتى لا يزال لها التركيب Kan^r، فإن جين المتنقل Kan^r تم قطعه وفصله من الجين *lac* وتم إعادة إدخاله في مكان آخر. نسبة ضئيلة من هذه المرتدات Lac^+Kan^r كانت auxotrophic لعديد من المواد الغذائية، كما هو متوقع فى حالة حدوث إعادة التداخل في مناطق أى مواقع إعتباطية random sites.

يمكن أن يحدث الإنفصال فى الخلايا *rec* A^-، موضحا أن الإنفصال لا يكون ببساطة نتيجة للتبادل المتماثل بين التتابعات المجاورة لتتابعات الهدف.

الظواهر الوراثية للبكتريا التى للمتنقلات دور وسيط فيها

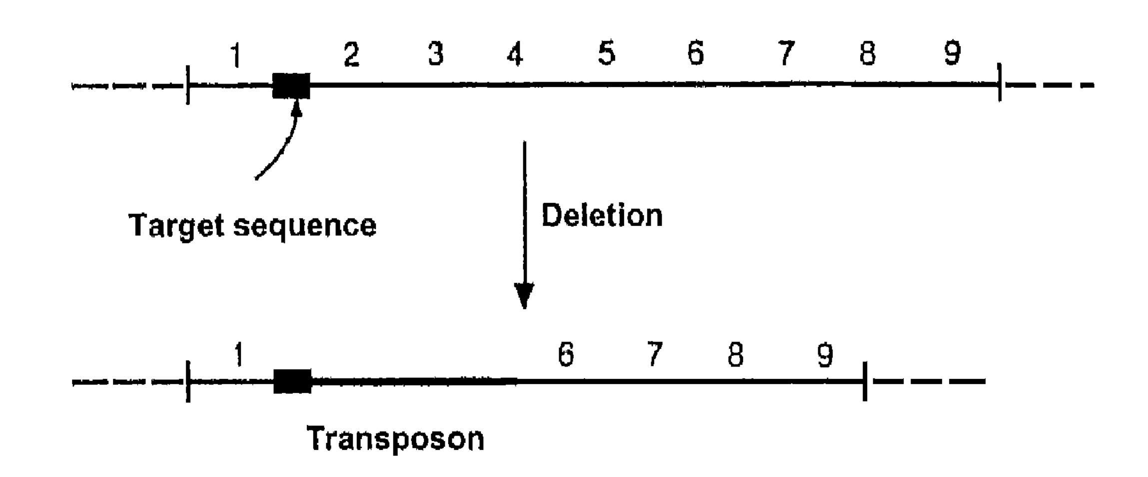
Genetic Phenomena Mediated by Transposons

تتوسط المتنقلات عديد من الظواهر الوراثية فى البكتريا مثل إعادة ترتيب الجينات وتكامل البلازميدات مع الكروموسوم.

عندما يوجد المتنقل فى الكروموسوم أو البلازميد، فإن تكرارية حدوث حالات النقص المتقاربة nearby deletions تزداد حوالى مائة مرة إلى ألف مرة. عند حدوث حالات النقص هذه فإنه من المعتاد وجود ما يأتى:

١ - ينشأ النقص عند نهاية أى عند طرف العنصر أى كروموسوم أو بلازميد.

٢ - يحد المتنقل بواسطة نسخة واحدة فقط من تتابع الهدف (لهذا يمتد النقص من جانب واحد من المتنقل) هذه الصفات موضحة فى الشكل (شكل ٣٦).

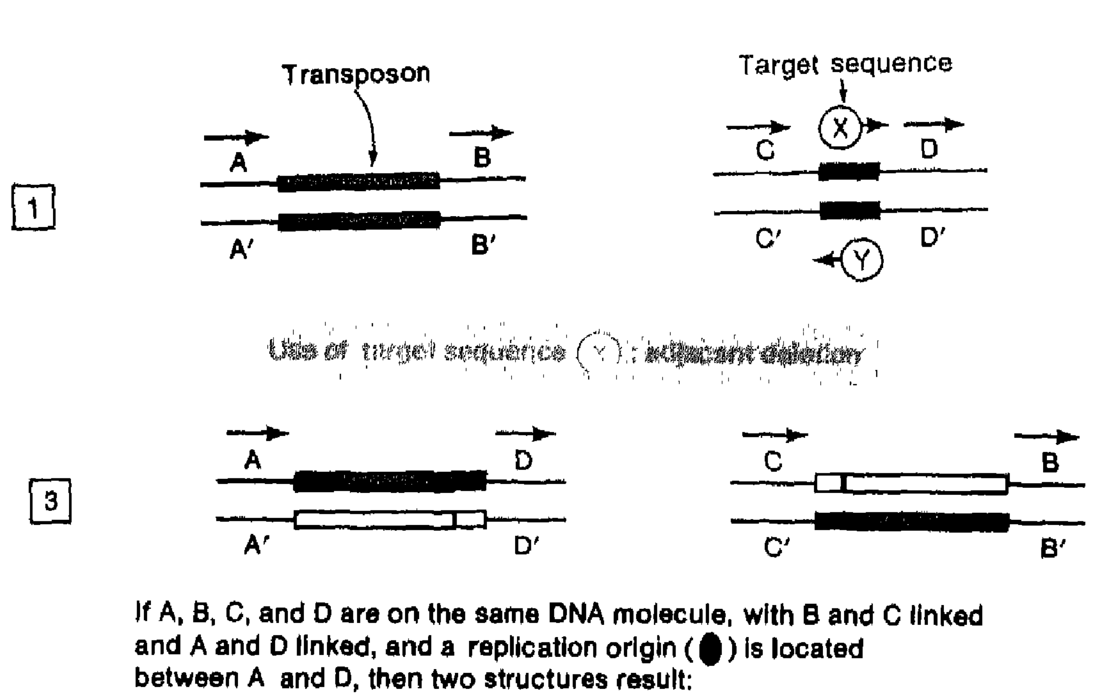


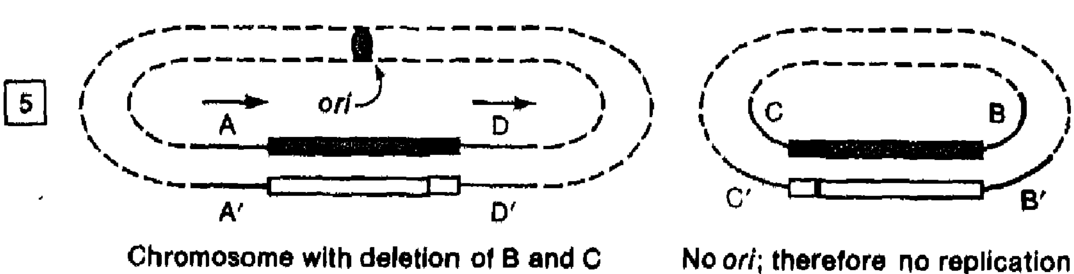
شكل ٣٦: حدوث النقص مع وجود المتنقل كوسيط. حدث نقص للأجزاء٢,٣,٤,٥ وحل محلها المتنقل

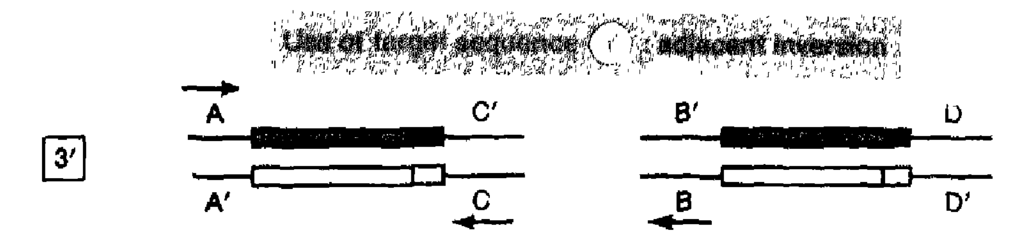
تكرارية الإنقلابات يتم زيادتها بالقرب من أو مجاورة للمتنقلات. فى هذه الطريقة، البداية بتتابع ... ثم المتنقل ثم [sequence ... transposon- abcdef]- abcdef وحيث أن من a إلى f تكون جينات ملاصقة للمتنقل، ثم يحدث حدث يسبب ما يأتى أى حدوث تتابع مثل transposon- [5]- ba- transposon-[5] cdef يعبر عن أو يشير إلى تتابع هدف يتكون عرفيا من ٥ زوج قاعدة arbitary 5- bp target sequence. لاحظ أن أب أى ab تم إنقلابها وأن تتابع هدف جديد والمتنقل تم تضاعفها أى إزدواجهما وتحيط بالتتابع المقلوب. الآليات الجزيئية لحدوث كل من النقص والإنقلاب غير معروفة ولكن يمكن أن تشرح على أساس أنها إنتقال متداخل عقيم كما فى الشكل

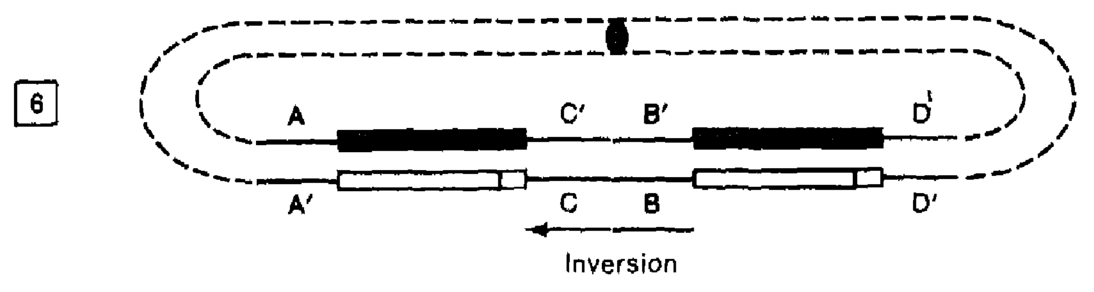
(شكل ٣٧ an abortive transposition event. فى هذا الشكل، النظام والحالة الموضحة فى الشكل (شكل ٣٤) تم تكرارها- لهذه الأجزاء أى الشظايا A و B تكون مفصولة بواسطة المتنقل، وأن القطع أى الأجزاء Cو D تحيط بتتابع الهدف كما هو موضح فى الجزء I و 1 فى الشكلين ٣٤ و ٣٧. الجزء ٣ يوضح أن النظام أو الترتيب المحيط بكلا النسختين من المتنقل بعد الخطوات I خلال III للشكل (شكل ٣٤) تم إكتمالها.

لو أن كل من القطع أى الأجزاء فى الجزء 1 من الشكل عبارة عن دوائر أى حلقات فإن القطعتين فى الجزء (الشكل) ٣ لابد أن يتحدا ليكونا حلقة كما تم شرحه فى الجزء السابق. لو أن القطعتين جزء من جزيئ دنا مفرد (مثال ذلك، كروموسوم)، على أى حال، عملية الإنتقال المتداخل سينتج عنها الجزيئين الموضحين فى الجزء (٥). لاحظ أن جزيئ واحد فقط فى هذا الجزء يحتوى على منشأ وأصل التكرار هذا الجزيئ فقد أيضا القطعة المحتوية على B و C، ولذلك، فإن هذا الجزيئ يصبح ناقص الجزء B و C. الحلقة الصغيرة المحتوية على B و C لا تحتوى نسخة من منشأ أو أصل التكرار ولذلك لا يمكن أن تتكرر أى تتضاعف. ولذلك، لو أن هذه العملية فى مجموعها حدثت فى بكتريا فإن الحلقة الصغيرة لن تتكرر أى لن تتضاعف، ونسل البكتريا سيحتوى فقط كروموسوم ناقص. لاحظ أن الجزء أو القطعة الناقصة تكون قريبة تماما وملاصقة لأحد طرفى المتنقل وتشمل جميع الجزء (أى تتابعات القواعد) الفاصل بين المتنقل وتتابع الهدف.









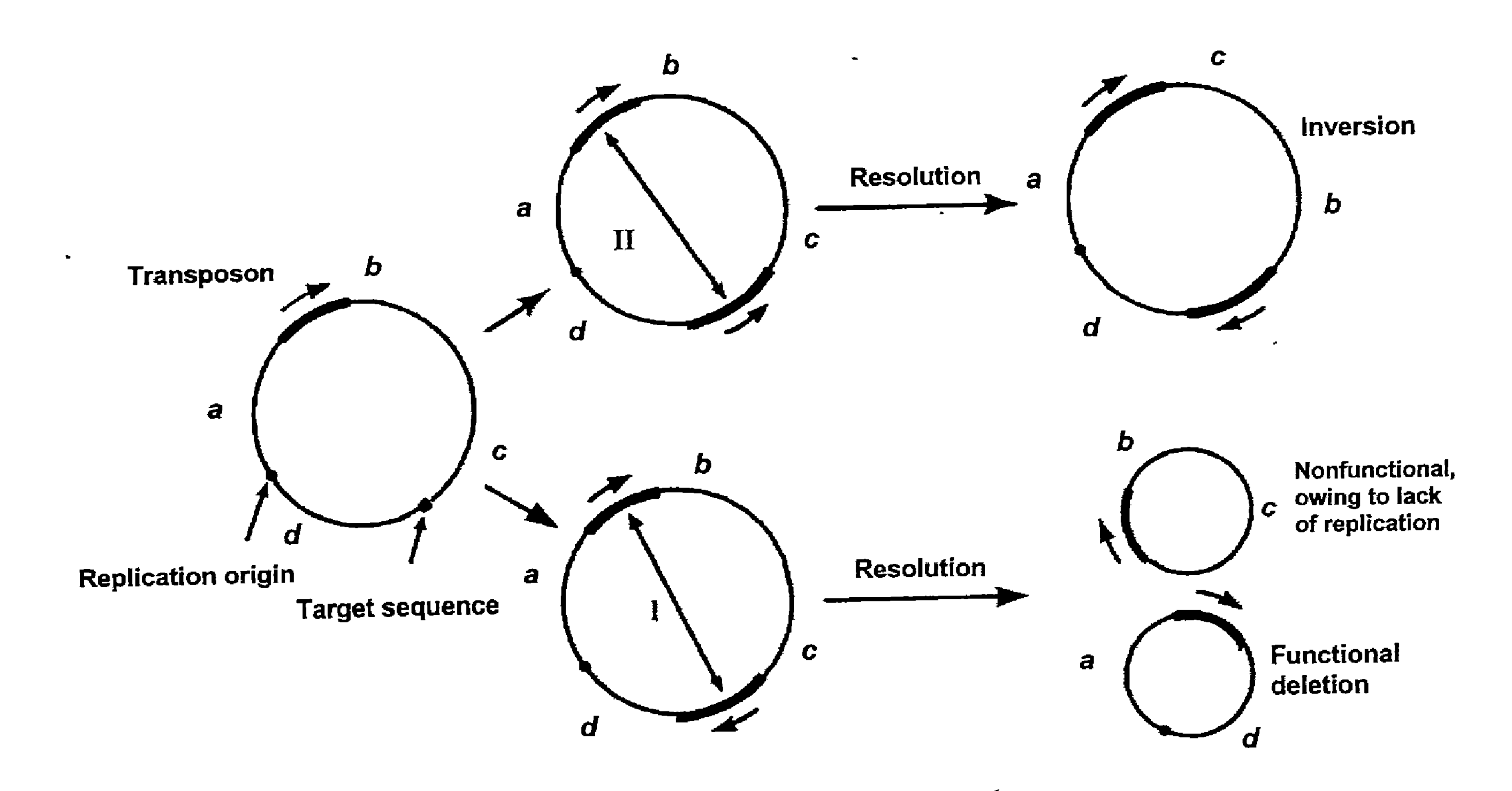
شكل ٣٧ : شكل توضيحى لتوضيح حالات النقص والانقلاب التى سبق ذكرها فى الشكل السابق رقم (٣٤). – الجزء 1 فى الرسم له نفس الترتيب فى جزء I فى الشكل رقم ٣٤، – الجزء 3 والجزء 3ا يشابه ويوضح التركيب فى جزء II فى الشكل رقم ٣٤. عدا الإختلاف فى أن توجهين مختلفين لتتبع الهدف قد أستعملا، – الأسهم توضح إتجاه النسخ.

الجزء السفلى من الشكل (شكل ٣٧) يوضح كيف أن الإنقلابات الوراثية يمكن أن تحدث أى كيف يتم إنتاجها. فى هذه الحالة، نظام أو ترتيب أو منظومة الجين أى جين البداية (الإبتدائى) هى ذاتها التى نتج عنها أى أنتجت النقص، ولكن تتابع الهدف له توجيه عكس توجيه المتنقل (ولهذا الخيوط الملتحمة فى الجزء I فى الشكل ٣٤ تكون معكوسة)، وهذه تكون مساوية أو مماثلة لتداخل المتنقل فى التوجيه العكسى. عملية الإنتقال المتداخل هذه تسبب نشوء نظام أو الأنظمة الموضحة فى الشكل الجزء 31. لاحظ أن التوجيهات A، C تم إنقلابها مع النظر ومع الأخذ فى الإعتبار منظومة أى نظام أى تركيب البداية أو الإبتداء، كما هو حالة التتابعات C، D. ولهذا لو أن القطع الإبتدائية أى قطع الإبتداء نتجت عن جزيئ دنا مفرد فإن النظام أو المنظومة الموضحة فى جزء 6 يكون هو الناتج أو النتيجة. فى هذه الحالة، لا نفقد أى جزء من دنا (أى لا يوجد أى نقص)، ولكن الجزء أو القطعة بين طرف واحد من المتنقل وبين تتابع الهدف يتم إنقلابها مع الأخذ فى الأعتبار القطعة الأخرى- هذه حالة إنقلاب وراثى.

من الممكن أيضا أن تنشأ الإنقلابات بواسطة إعادة صياغة متماثل متجانس homologous recombination بين التكرارات المقلوبة inverted repeats بالرغم من أن هذه الأحداث نادرة. آلية بسيطة والتى يمكن أن تحدث بها هذه الحالة موضحة فى الشكل (شكل ٣٨). يحدث الإنتقال المتداخل عند تتابع الهدف (موضحا بواسطة مربع فى الدائرة اليسرى للشكل) فى الجزيئ المحتوى على المتنقل. التداخل يمكن أن يحدث فى أحد الأتجاهين وهى التوجيه المتكرر المباشر (I فى الشكل) direct repeat orientation أو التكرار المنقلب inverted repeat (II فى الشكل). فى حالة متنقل قادر على الفصل والإحلال، يمكن أن يتواجد موقع متخصص للتبادل a site- specific exchange بين أو خلال متنقلين، يمكن أن يحدث التبادل بطريقة أخرى، وهو تبادل معتمد متماثل أو متجانس a homology- dependant exchange يتم حدوثه فى وجود

وسيط فى هذه العملية هو بروتين RecA. والذى ربما يحدث لو أن المتنقلات فى حالة تكرار مباشر direct repeat array، فإن التبادل ينتج عنه حلقتين. كما فى الموديل الموضح فى الشكل (شكل ٣٧)، لأن الكروموسوم أو البلازميد يحتوى عادة أصل أى منشأ تضاعف مفرد a single replication origin، والعنصر element الذى يحتوى هذا المنشئ أى الأصل هو فقط الذى يستمر، هذا العنصر فقد قطعة من دنا وهكذا تحدث طفرة نقص deletion mutant. لو أن المتنقلات فى تنظيم أى منظومة التتابع المقلوب، نتيجة ذلك هو تكوين تتابع مقلوب inverted sequence كما هو واضح فى الجزء الأيمن من الشكل. لاحظ أن النتائج النهائية لهذه الرسومات التوضيحية الموضحة فى الشكلين (شكل ٣٧ وشكل ٣٨) هما تماما متماثلين. توجد موديلات أخرى كثيرة تشرح أيضا حالات نقص وإنقلاب.

دنا المتنقل تم إدخاله فى داخل تتابع الهدف فى التوجيه I أ، II. الحلقة يمكن أن تكون كروموسوم أو بلازميد. حدوث resolution بواسطة تبادل خيوط فى موقع متخصص a site-specific strand exchange والذى تم توضيحه فى الشكل بالأسهم ذات الوجهين (أى السهمين). أو يحدث التبادل بطريقة homologous sequences وينتج عنها نقص فى I وإنقلاب فى II.



شكل ٣٨: شكل يوضح كيفية النقص والإنقلاب.

الفاج MU
Phage Mu

فاج البكتريا إ. كولاى المسمى Mu عبارة عن فاج معتدل قادر على عمل كل من lytic and lysogenic growth. إسم Mu هو إختصار للكلمة mutator لأن ٣% من جميع حالات Mu lysogens طفرات تحدث فى بعض الجينات التى يسهل التعرف عليها. تنشأ الطفرات لأن Mu تدخل دنا الخاص بها فى أماكن موزعة إعتباطيا على كروموسوم إ. كولاى. إدخال دنا فى الكروموسوم البكتيرى أى كروموسوم العائل عبارة عن مرحلة إجبارية فى دورة حياة Mu. علاوة على ذلك، ينتج عن الأدخال أى التداخل دائما تضاعف تتابع الهدف. وهكذا فإن Mu عبارة عن متنقل عملاق أو مارد giant transposon والذى أكتسب خواص ووظائف الفاج والتى تمكنه من أن يعبأ فى غلاف الفاج phage coat، يحلل خلية العائل وهكذا نتيجة لذلك يترك أو يغادر الخلية، أى يتحرر من الخلية.

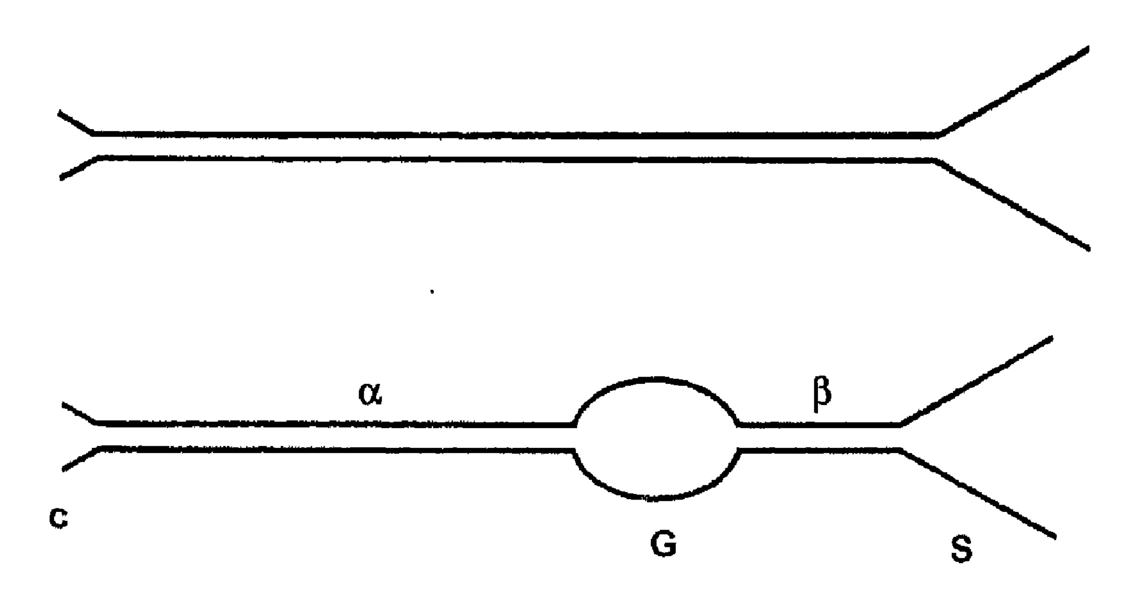
دنا MU DNA MU:

يحتوى Mu حوالى ٣٨ ك ب 38 kb من دنا الشريطى. فى عشيرة من جزيئات الفاج Mu، على أى حال؛ فإن نهايات كل جزيئ دنا تكون مختلفة. عند وجود عينة من Mu دنا تم دنترتها ثم عكس الدنترة لإعادتها لحالتها الطبيعية، فإنه نتيجة الفحص بالمجهر الإلكترونى لحلزونى دنا (التى تحتوى خيطين مفردين تم إشتقاقهما من جزيئات ثنائية الشريط أى مزدوجة الشريط مختلفة غير متماثلة) نتج تركيبين كما فى الشكل (شكل ٣٩). جميع المناطق وحيدة الشريط أو الخيط تتكون من تتابعات غير مكملة لبعضها noncomplementary. تجارب أخرى وضحت ما يأتى:

١ - التتابعات الغير مكملة لبعضها عند الأطراف أى النهايات، عبارة عن قطع دنا بكتيرى والتى تختلف من جزيئ دنا عن الذى يليه.

٢ - لو أن قطعة دنا Mu فى المنطقة ألفا α إزدادت فى الطول (بواسطة إدخال دنا غريب) فإن الجزء الغير متجانس فى الطرف الأيسر (c) يحتفظ بطول الطراز البرى بينما القطعة فى الطرف الأيمن (S) تصبح أقصر طولا.

٣ - الجزيئات العكسية renatured يجب أن تحتوى جزء غير مزدوج unpaired يسمى العقدة G loop G. خيطى العقدة G وهى دنا الفاج متماثلين ولكن واحدة قد تم عكس إتجاهها (تم قلبها) بالنسبة للأخرى. وهكذا، فإن العقدة G لها تركيب موضح فى الشكل (شكل ٤٠). عادة أثناء دورة حياة الفاج فإن القطعة G تصبح مقلوبة بواسطة إعادة الصياغة الوراثى genetic recombination. الأشكال الطبيعية والمقلوبة تسمى G(+) و G(-) على التوالى: توافق وأزدواج annealing خيط يحتوى G(-) مع خيط تكميلى مكمل يحتوى G(+) ينتج عنه عقدة G. العقدة G تؤثر على المدى العوائلى لــ Mu ولكنها غير تابعة أو متعلقة بالإنتقال المتداخل.



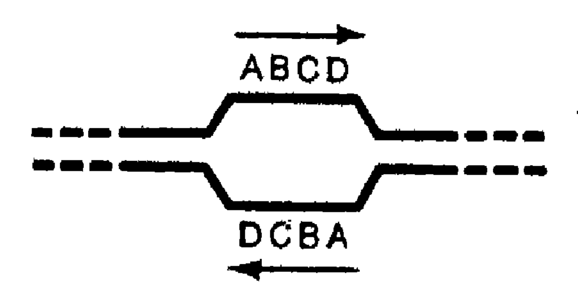
شكل ٣٩: تركيب المتنقل أو الفيرس دنا Mu (Mu DNA). وذلك بعد الدنترة وعكس الدنترة. العلامات المختلفة C، G، S، β، α عبارة عن مواقع مميزة معروفة فى دنا الهجين heteroduplexes

تكرار ونضج دنا Mu:
Replication and Maturation of Mu DNA

رقم ١ ,٢ فى الجزء السابق تم شرحه بالحقيقة أن الإنتقال المتداخل إجبارى فى حالة تضاعف دنا Mu. بعد إصابة خلية البكتريا بمدة قصيرة، فإن دنا Mu يتم إدخاله إعتباطيا فى أى موقع فى صبغى أى كروموسوم إ. كولاى. التتابعات الطرفية البكتيرية لا يحدث لها تداخل:

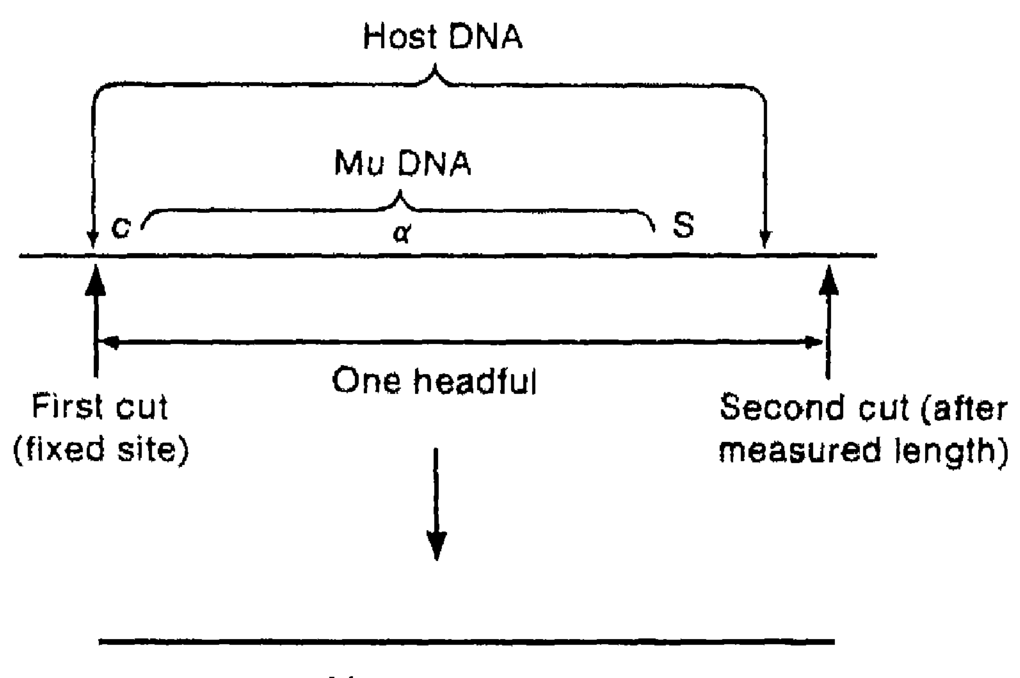
فقط القطعة Mu تم إدخالها كما هو المعتاد فى حالة الإنتقال المتداخل. تكرار أى تضاعف دنا Mu يحدث بواسطة إنتقال متداخل متكرر أو مكرر إلى أماكن عديدة مختلفة فى الصبغى، والذى يشرح ويوضح الإرتباط بين دنا Mu مع قطع مختلفة من دنا البكتريا الذى تم شرحه فى رقم ١ فى الجزء السابق.

عديد من التجارب الفيزيائية وضحت أن إدخال نسل دنا Mu فى مواقع مختلفة تحدث خلال دورة التحلل lytic cycle. هذا تم الأشارة إليه أولا، على أى حال، بواسطة تجارب وراثية. الخلايا المحتوية على F'lac تم إصابتها بواسطة الطفرة Mu والتى كانت غير قادرة على قتل الخلايا. قليلا بعد الإصابة، فإن الخلايا تقابلت مع بعضها mated مع إناث مناسبة وتم رصد إنتقال F' lac. الجزء المنقول F' *lac*، يحتوى عادة دنا Mu متكامل، وموقع التداخل يكون متغير. بإستعمال بلازميدات F' مختلفة تشير وتوضح أن Mu يمكن أن يتداخل فى أجزاء مختلفة من دنا.



شكل ٤٠ : تركيب a G loop للمتنقل أو الفيرس Mu DNA يوضح حالة إنقلاب فى تتابعات القواعد فى G ويرمز لها A ثم B ثم C ثم D.

لا يوجد دنا Mu إطلاقا حر فى داخل الخلية. دنا جزيئات الفاج تحتوى دائما دنا بكتيرى طرفى. هذه التتابعات تنشأ من عمليات التعبئة packaging. تعبئة دنا تحدث كما يلى (شكل ٤١): نظام نضج دنا الفاج DNA maturation system يتعرف على الطرف c للفاج المكمل أى المتكامل مع دنا Mu ويحدث قطع فى دنا العائل حوالى ١٠٠ قاعدة فى يسار دنا الفاج. تبدأ التعبئة عند هذه المرحلة، ثم تتم تعبئة رأس الفاج. القطع الثانى عند النهاية S، يتم تحديد موقعه بواسطة كمية دنا والتى يمكن أن تتلائم وتناسب مع رأس الفاج. ملأ الرأس لمرة واحدة يزيد عن طول تتابعات دنا الفاج والتى تشرح فى رقم ٢. هذه تسمى آلية ملأ رأس الفاج headfull packaging mechanism.



شكل ٤١: شكل يوضح إدخال الفيرس أو المتنقل Mu DNA وأن طرف الفيرس يتكونان من دنا العائل أى تتابعات دنا العائل فى الطرفين.

تحديد موقع تداخلات Mu على الخريطة فى حالة Mu lysogens توضح أن عدد مواقع التداخلات الممكن كبير جداً. لو أن مزرعة تم فيها إدخال Mu والطفرات الناتجة عن Mu تم عدها فقد وجد أن تكرارية التداخل فى جين معين تكون متناسبة

عامة مع حجم الجين. لو أن الجين a ضعف حجم الجين b، سيكون لذلك فى المتوسط ضعف عدد الطفرات a بالنسبة للطفرات b. مجاميع التداخلات فى جين مفرد، على أى حال، توضيح أن التداخلات فى جميع المواقع لا تكون متساوية الإحتمالات فى حدوثها. مثال ذلك، بين ٧٥ تداخل لـــ Mu فى الجين *lac* Z فإن ٥٠ موقع تداخل فقط تم التعرف عليها وتميل أن تكون كلها فى منطقة واحدة من الجين. لأن الجين يحتوى ٣٠٦٣ bp أى 3063 bp فإن المتوقع لو أن التداخل كان إعتباطيا تماما فإنه لن يوجد مواقع تداخل متكررة أو متضاعفة.

. No insertion sites would be duplicated

لا يوجد تتابع أو تتابعات قواعد معين، على أى حال، تم رؤيته عند مواقع التداخل، موضحا أن التخصص لا يكون راجع إلى التعرف على تتابع قواعد معين. لأن المتنقلات تتداخل فى مواقع عديدة مختلفة وتسبب حدوث طفرات قطبية قوية وأن التداخلات يمكن أن يتم إختيارها عادة بواسطة إنتخاب مباشر وذلك بإستعمال متنقل يشفر أى محتوى مقاومة للمضادات الحيوية. تعتبر المتنقلات شديدة الفائدة فى بناء وتكوين وتخليق سلالات طفرة. إستخدام المتنقلات لتخليق وتكوين السلالات معروف آليته وسيتم شرحه فى مؤلف قادم إن شاء الله.

المتنقلات والتطور

Transposons and Evolution

بعيداً عن حالة المقاومة للمضادات الحيوية، يبدو أن المتنقلات لأول وهلة ليس لها أى فائدة للخلية. هذه الحالة ربما يتم حدوثها بدرجة أشد للعناصر IS. وهكذا، من المناسب أن تسأل لماذا المتنقلات تم إستمراريتها أثناء زمن التطور. عامة، أن جين ليس له وظيفة أو أى دور فى الخلية سيتلف فى النهاية يصبح غير معروف وغير وظيفى أى ليس له دور وظيفى وعادة يكون ناقص أو يختفى. لبعض الوقت،

تم الإعتقاد أن المتنقلات هى مثال كما هو قد سمى دنا الأنانى selfish DNA وهى جزء من دنا باقية ومثابرة فقط لكى تحافظ على نفسها فى البقاء دون وظيفة تؤديها أى أنها أنانية تعيش لنفسها فقط. مثال ذلك، خلية بها نسخة من عنصر IS عديم الفائدة أى عديم القيمة unseless ستحفظ المتنقل لو أن الإنتقال المتداخل (والذى يضاعف العنصر) يحدث بسرعة أكبر عن الطفرة أو فقد العنصر. هذه الحالة يمكن أن تشرح حقا بقاء وثبات كثير من المتنقلات. تقترح التجارب، على أى حال، لو أن المتنقل لا يقدم ميزة أو فائدة إنتخابية لخلية مفردة، فإن وجوده فى المستقبل يعطى ويمنح ميزة لعشيرة الخلية. هذا الإقتراح أو هذا الموضوع مبنى على أسباب وهى أنه لأن التطور يحدث نتيجة لتراكم الطفرات، فإن عملية تسرع من حدوث الطفرات قد تسرع من حدوث التطور.

النمو المستمر للبكتريا فى حالة chemostat معروف. مزارع chemostats ذات فائدة فى دراسة سرعة الطفرات والتطور لأن كلا الحالتين وتكاثر الخلايا يمكن المحافظة عليها إلى ما لانهاية. عديد من المعامل قارنت بين سرعة التكاثر للخلية المحتوية على متنقل (Tn5 و Tn10 تم دراستها) مع خلية isogenic. تكون خالية من المتنقل. مدة الجيل لهذه المزارع يتم قياسها بطريقة قياسية وأن مدة الجيل لم تكن مختلفة. فى حالة chemostat، على أى حال، إنه من الممكن تحضير مخلوط إبتدائى يحتوى، على سبيل المثال، ١٠٥ خلايا طراز برى من إ. كولاى وخلية واحدة إ. كولاى ذات تداخل Tn10. بعد نمو طويل (مئات من الأجيال)، النسبة بين الخلايا المحتوية على متنقلات إلى خلايا الطراز البرى يمكن تحديدها. دراسة عديد من مزارع chemostat أوضحت أن بعض المزارع إحتفظت بالنسبة الأصلية ١٠$^{-5}$ ولكن مزارع أخرى إحتوت أساسا على خلايا محتوية Tn10. لا توجد مضادات حيوية، ولذلك فالخلايا المحتوية Tn10 لا تمتلك أى مميزة إنتخابية لهذا السبب. المزارع التى فيها الخلايا محتوية على Tn10 ربحت "had "won وتم فحصها للإنتقال المتداخل

لتحديد هل حدوث الإنتقال المتداخل له دور فى نمو أسرع. عدد النسخ للجين Tet^r الموجودة فى Tn10 لم تزداد، ولكن عدد النسخ فى الطرف IS10R للمتنقل Tn10 تزداد عادة واحد. (Tn10 عبارة عن متنقل مركب composite transposon له طرازين مختلفين قليلا من IS10 وهى IS10L، IS10R النوع L أى نهاية اليسار left والنوع R أى نهاية اليمين right). لا توجد زيادة فى كل Tn10 أو IS10R تم رؤيتها فى المزارع والتى فيها خلايا الطراز البرى قد ربحت had won. علاوة على ذلك، أوضحت التحاليل الكيموحيوية أن إدخال IS10R فى الخلايا المحتوية على Tn10 تكون متمنطقة localized فى منطقة صغيرة تماما من الصبغى البكتيرى أى أن لها منطقة محددة صغيرة على الكروموسوم. وهكذا فإن الإدخال مرتبط مع سرعة نمو أسرع قليلا من السرعة العادية.

ترجمة ذلك وتجارب أخرى متعلقة بهذه التجارب هو أن الإنتقال المتداخل ينتج عنه طفرات مفيدة، يعنى ذلك أن الخلايا المحتوية على متنقلات تتكون أو تنشأ اسرع. تأثير مشابه تم ملاحظته مع الخلايا المحتوية على جينات mutator وهى جينات تضفى على الخلية تشجيع لزيادة سرعة التطفر أى زيادة معدل الطفرات.

من الواضح أن طفرات تم تشجيعها بدرجة مؤكدة أى زيادة سرعة معدل الطفرات بدرجة مؤكدة الناتجة عن متنقل ممكن أيضا أن تكون ضارة فى البكتريا، لأن الإنتقال المتداخل عبارة عن عملية تكرار replicative process عادة، فإن عدد العناصر يبدو وأنه قادر على الزيادة إلى ما لانهاية. سيكون ذلك ضار لخلايا البكتريا وتبعا لذلك المتنقل لأن جينوم البكتريا سيضار أو يفسد لأنه زائد أو خارج عن قدرته أى أكبر من قدرته أو طاقته لحمل وظائف الخلية الضرورية. وهكذا يبدو أن الإنتقال المتداخل سيكون محدود بطريقة ما، وحقا يبدو أن الإنتقال المتداخل مضبوط ومنظم ومنتظم بدقة carefully regulated. الدليل على هذا النظام تم الحصول عليه من

تجارب فيها الإنتقال المتداخل تم إدخاله فى خلية خالية من نسخ هذا العنصر. يبدأ حدوث الإنتقال المتداخل فى خلال عدة أجيال مع وجود تكرارية فى الحدوث. حالا، تتناقص سرعة الإنتقال المتداخل وفى النهاية تكتسب الخلية عدد ثابت من نسخ المتنقل، العدد الخاص بالنسخ المختلفة هو صفة مميزة لكل متنقل أو عنصر الآلية المنظمة أو آلية التنظيم تختلف فى المتنقلات المختلفة.

عدد النسخ لكل متنقل معين فى خلية البكتريا يكون أقل من عشرة عادة. فى الكائنات حقيقة النواة الراقية، على أى حال، وحيث أن نسبة كبيرة نسبيا قد تصل إلى ٣٠% من دنا يمكن أن تحتوى عناصر متنقلة transposable elements. فإن عدد النسخ لكل متنقل أو وحدة عنصر individual element قد تكون مئات الآلاف.

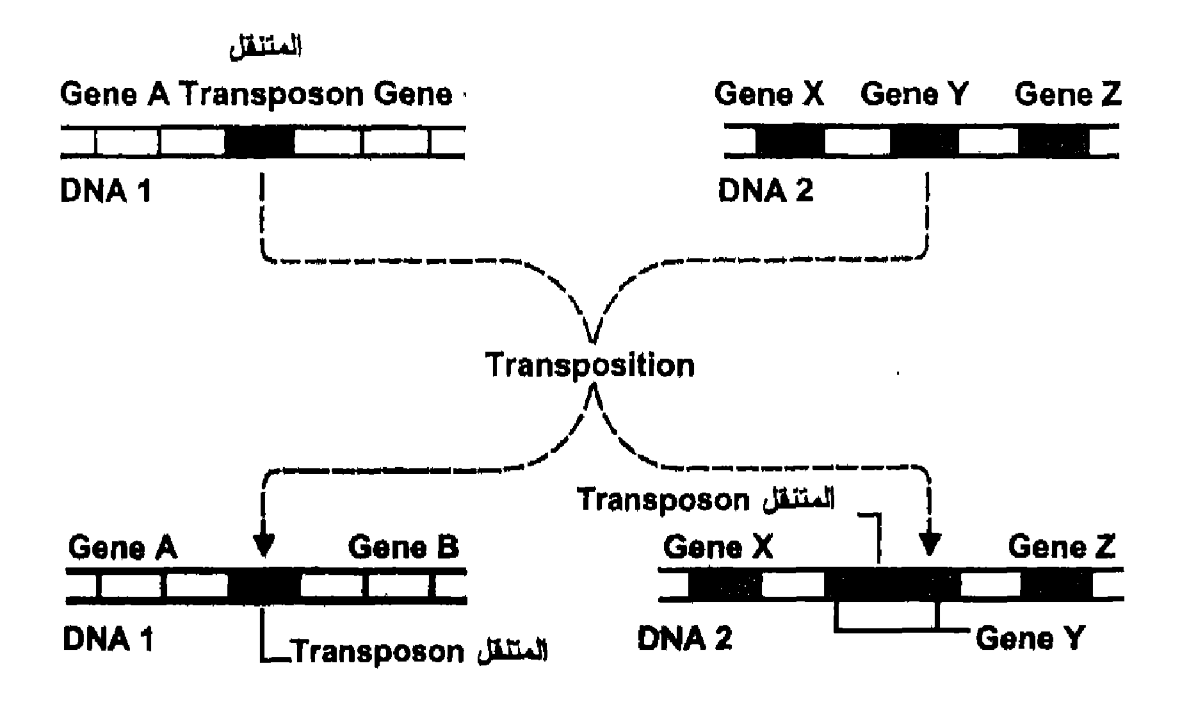
ملخص للمتنقلات
A Summary Of Transposons

المتنقل transposon عبارة عن وحدة من دنا متحركة a mobile genetic element وتسمى transposable genetic element وهى معروفة بإسم الجينات القافزة jumping genes أو الجين القافز jumping gene. وهى تتميز بأنها يمكن أن تكون مكملة لأماكن مختلفة فى الطاقم الوراثى أى أنها تلتحم بأماكن مختلفة فى الطاقم الوراثى، يكون ذلك بواسطة التحرك من مكان إلى آخر أو أنها تنتج نسخ عديدة من نفسها وهذه تلتحم بأماكن عديدة من الطاقم الوراثى. أبسط أنواع المتنقلات تسمى تتابعات متداخلة أو تداخلية insertion sequences وفيها كل وحدة تتكون من ٧٠٠-١٥٠٠ زوج قاعدة وفى كل طرف من الطرفين يوجد تتابع معين للقواعد قصير مكرر عديد numerous short repeatednucleotede sequences. المتنقلات الأكبر والأكثر تعقيدا تسمى المتنقلات المركبة composite transposons، وهى تتكون من جزء مركزى .ى وسط يمكن أن يحمل جينت فعالة functional genes ويوجد

على جانبيه تتابعات تداخلية أو متداخلة insertion sequences. كما أول إكتشاف لهذه المتنقلات بواسطة باربارامك كلينتوك Barbara Mc Clintock فى الذرة فى الأربعينات، ولم تلق هذه النظرية قبولا لفترة ولكن إتضح بعد ذلك صحتها وأتضح وجود هذه المتنقلات فى حقيقيات النواة وبدائيات النواة مثل البكتريا. هذه المتنقلات يمكن أن تؤثر على الجين تأثير ضار وتؤثر على وظيفته وكفاءته ويمكن أن تسبب نقص وإنقلاب فى جزء من دنا وهكذا تؤثر على الشكل الظاهرى والتركيب الوراثى للكائن الحى. وهى لها دور فى repetitive DNA فى حقيقيات النواة. باربارامك كلينتوك (١٩٠٢-١٩٩٢) عالمة نبات ووراثة أمريكية وكانت تعمل فى Cold Spring Harbor Laboratory of the Carnegie Institute وقد نالت جائزة نوبل لذلك عام ١٩٨٣.

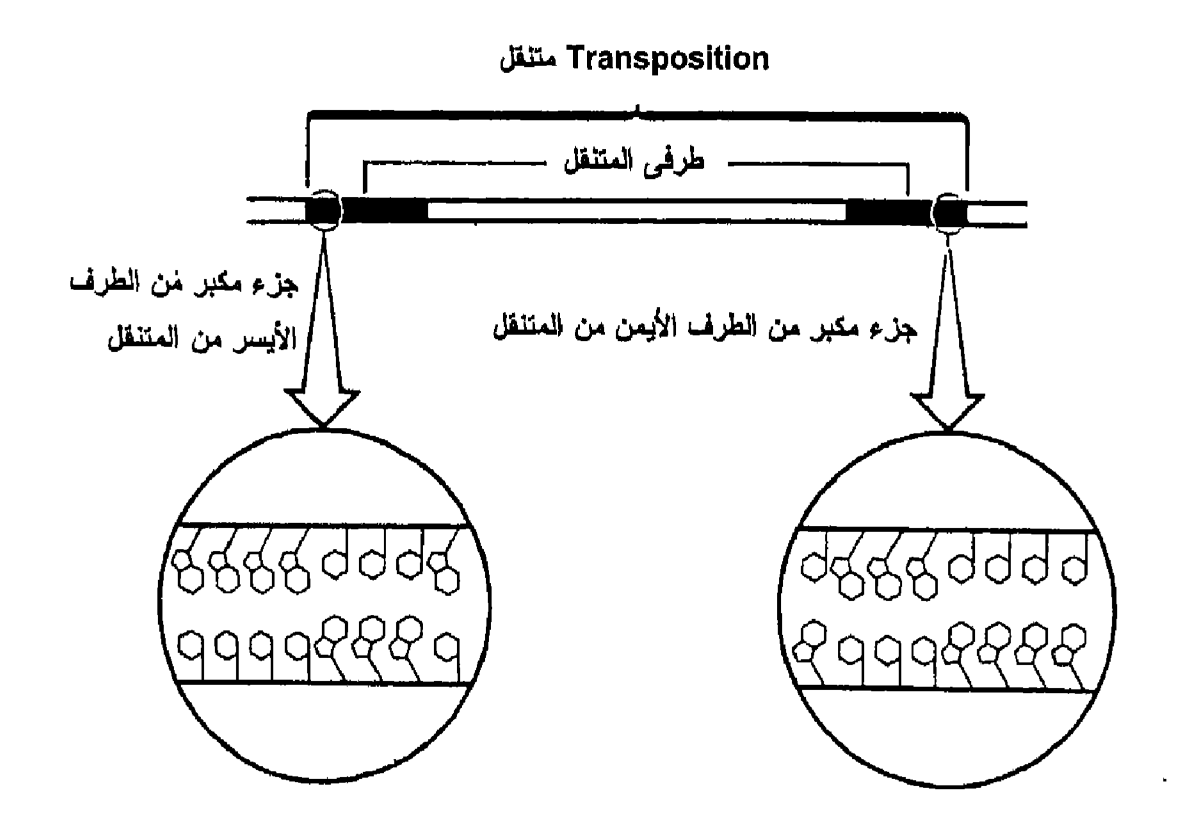
يمكن لمهندس الوراثة نقل جين أو جينات أو DNA مكن مكان إلى مكان آخر على جزيئ DNA آخر. يمكن أن يحدث ذلك طبيعيا فى جينات خلايا الكائنات الحية. حيث توجد أجزاء منفصلة أى غير متصلة من DNA يمكن أن تضاعف نفسها وأن هذه الأجزاء الجديدة المكررة من DNA يمكن أن تنتقل وتلتصق بجزيئ DNA آخر. يسمى هذا الجزء المنتقل من DNA والذى يتكون من تتابع عديد من النيوكليوتيدات باسم المتنقل transposon وتسمى عملية نقل المكان transposition. يمكن أن تتكون أجزاء عديدة غير متصلة من DNA على الكروموسوم تسمى بالمتنقلات transposons. تختلف نتيجة عملية نقل المكان تبعا للموقع المتنقل إليه المتنقلات فإذا أنتقل بين تتابع نيوكليوتيدات الجين فإنه يسبب توقف عمل الجين (شكل ٤٢). يكون الجين غير قادر على إظهار وظيفته أى على إنتاج البروتين الخاص به. يمكن أن يكون العكس عندما تدخل المتنقلات على الجزيئ الجديد بالقرب من الجين فإنها تسبب تنشيطه activates a gene. توجد المتنقلات فى مجموعات كبيرة من الكائنات الحية. ويمكن أن جميع الكائنات الحية تحتوى المتنقلات. تتميز هذه المتنقلات فى

جميع الكائنات الحية المختلفة بثلاث خائص. أولا تعتبر المتنقلات أجزاء متقطعة أى غير متصلة من DNA وكل جزء يتكون من عديد من النيوكليوتيدات كما أن كل متنقل له مكان محدد ثابت على جزيئ DNA المتنقل إليه. ثانيا تحتوى المتنقلات على نيوكليوتيدات يتكون منها مركب أو أكثر وهذه الأخيرة تكون المسئولة عن حركة المتنقلات من مكان إلى آخر. وجد أن هذه المركبات عبارة عن بروتين فى غالبية الحالات.



(شكل ٤٢): عملية إنتقال المتنقلات. إنتقال متنقل.

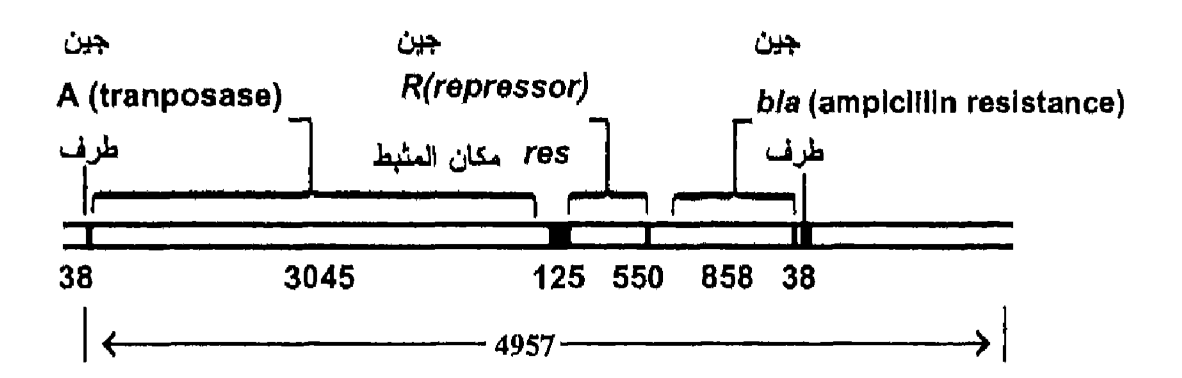
ولذلك فإن المتنقلات تحتوى على جينات مسئولة عن إنتقالها من مكان إلى آخر. ثالثا يتكون كلا من طرفى المتنقل من عديد من النيوكليوتيدات المتتابعة. يعتبر هذا التتابع للنيوكليوتيدات عبارة عن موقع أو مكان التعرف recognition site. أى مكان للتعرف هو عبارة عن منطقة أو جزء من المتنقل تستخدم مع عوامل أخرى أو أجزاء أخرى من المكونات factors فى حركة ونقل المتنقل. يكون تتابع النيوكليوتيدات فى مكان التعرف مقلوب أو معكوس inverted (شكل ٤٣) حيث يوجد فى طرف تتابع معين وفى الطرف الآخر تتابع مقلوب أى عكسى.



شكل ٤٣ : المتنقل وتركيب طرفيه

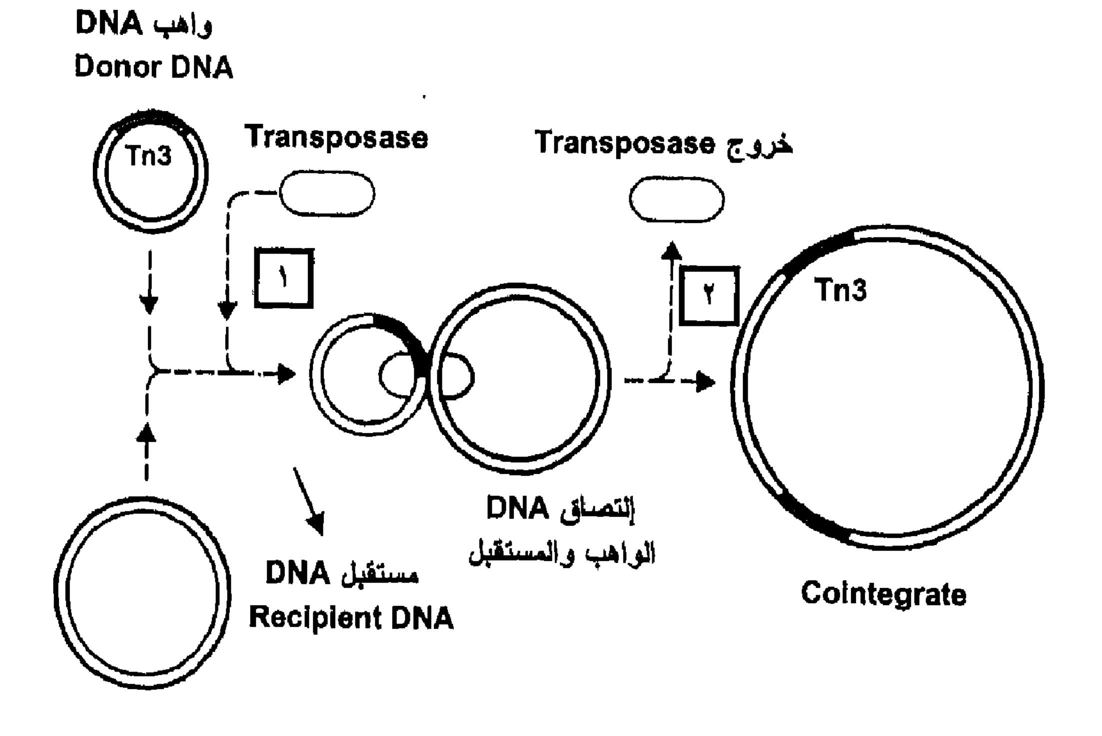
تختلف عملية نقل المكان transposition للمتنقلات فهى تختلف فى التفاصيل الجزيئية من متنقل إلى آخر. سيتم وصف هذه العملية فى أحد المتنقلات وهو Tn3. يوجد هذا المتنقل فى خلايا البكتريا ويحتوى على ثلاث جينات وهى A و R و bla (شكل ٤٤) وبالإضافة إلى ذلك يوجد ثمانية وثلاثون زوج من القواعد النووية فى أحد الطرفين ويوجد نفس العدد فى الطرف الآخر ولكن مرتبة بطريقة عكسية أى مقلوبة بالنسبة للطرف الآخر. يكون الجين bla بروتين يفسد الأمبسيللين ولذلك فإن أى خلية بكتيرية تحتوى Tn3 تكون مقلوبة للأمبسيللين. يكون الجين A بروتين يسمى transposase وهو مسئول عن إنتقال وحركة Tn3. عند إزالة الجين A فإن Tn3 تكون قادرة على الحركة. يكون الجين R مثبط والذى يرتبط بالجين A ويمنعه من تكوين transposase ويسمى المثبط repressor. ولذلك فإن المثبط والذ ى يتكون من البروتين يؤثر على حركة المتنقلات ويقلل إلى حد ما من درجة حدوثها. عند منع

نشاط جين R وذلك نتيجة لحدوث طفرة فى هذا الجين فإن الخطوة الأولى فى حدوث عملية نقل المكان للمتنقل Tn3 تزداد كثيرا.



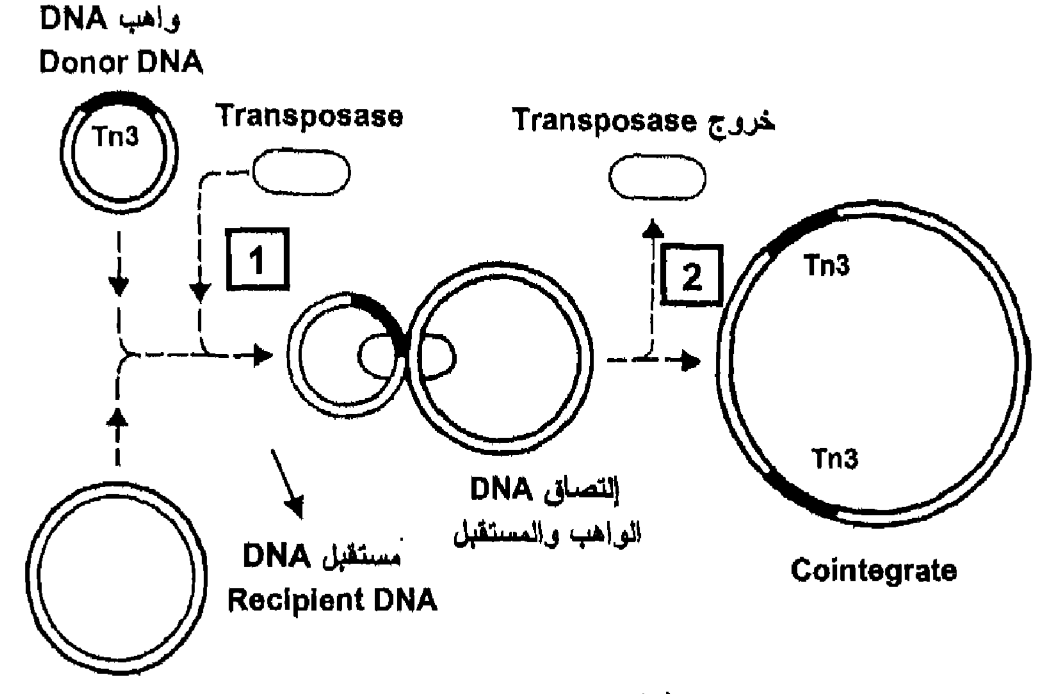
شكل ٤٤ : تركيب المتنقل يحتوى Tn3 على ثلاث جينات ومكان res هو مكان إلتصاق المثبط بالمتنقل. توضح الأرقام عدد النيوكليوتيدات فى كل جزء.

تحدث عملية نقل المكان فى المتنقل فى خطوتين (شكلى ٤٥، ٤٦). وفى الخطوة الأولى تحدث عملية إلتصاق أو إلتحام بين جزيئ DNA المحتوى على المتنقل Tn3 وبين جزيئ DNA آخر لا يحتوى على Tn3. يسمى الجزيئ المعطى للمتنقل بالـ DNA الواهب donor ويسمى الجزيئ المستقبل للمتنقل باسم DNA المستقبل recipient. يتوسط هذه الخطوة وجود بروتين transposase. ثم يتضاعف أى يتكرر جزيئ Tn3 بواسطة إنزيم DNA polymerase ويتم إلتحام طرفى الجزيئ الواهب بطرفى الجزيئ المستقبل لتتكون حلقة كبيرة تسمى cointegrate وبعد تمام أكتمال تكوين cointegrate فإن البروتين الداخل فى العملية والذى يسمى transposase ينفصل عن جزيئ الـ DNA. وفى الخطوة الثانية ينفصل الـ cointegrate إلى حلقتين. يلعب المثبط repressor المنتج بواسطة الجين R دور كبير فى هذه الخطوة حيث أنه يرتبط بالـ cointegrate ويسبب إلتواء DNA ليصبحا الـ Tn3 فى مواجهة بعضهما وموازيان لبعضهما.

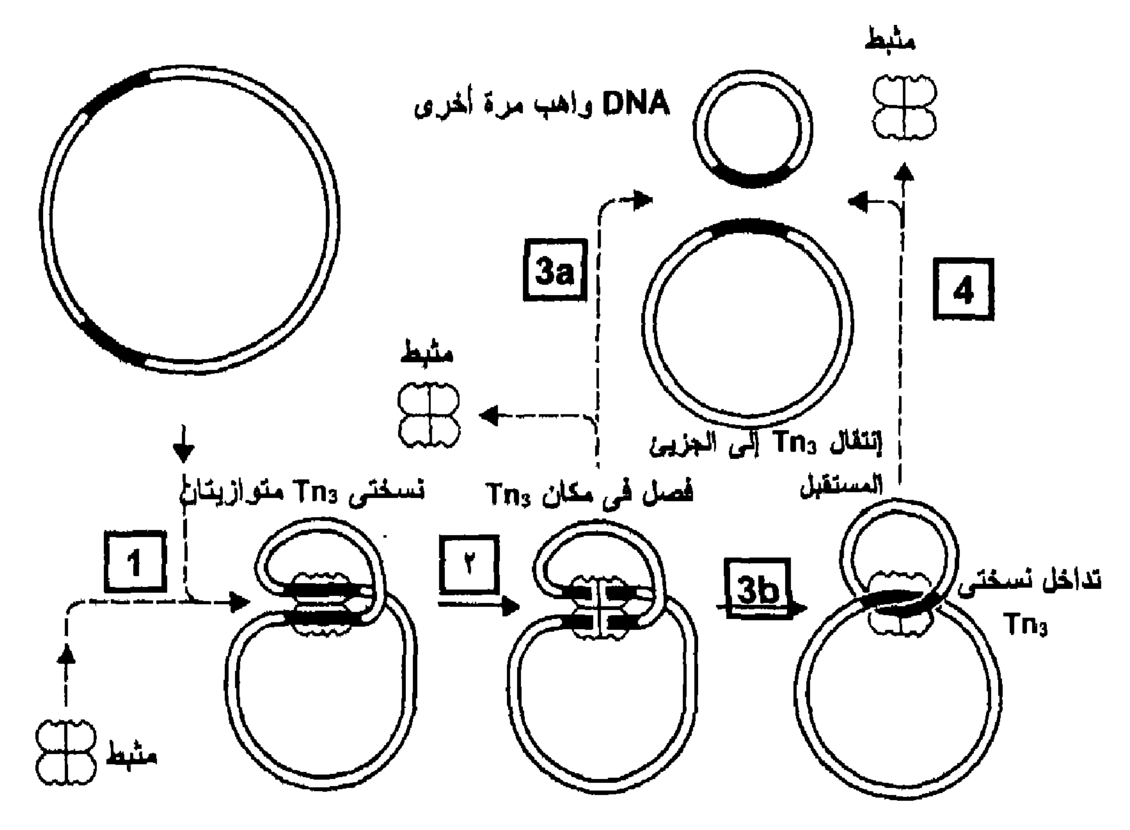


شكل ٤٥: خطوات تكوين cointegratic.

ثم يحدث كسر فى نسختى Tn3 فى المكان res. ثم يحدث توزيع بين DNA جزيئين Tn3. يحدث recombination بطرقتين وفى الطريقة الأولى يحدث إلتحام بين طرفى DNA فى المستقبل وفى الواهب دون تداخل كما فى الشكل 3a وحيث ينفصل المثبط. وفى الطريقة الثانية يحدث تداخل بين حلقتى interlocked DNA وحيث يوجد إنزيم يقوم بفصل الحلقتين وهو topoisomerase ويصبحا حلقتين منفصلتين مع إنفصال المثبط كما فى الشكل 4. وفى كلا الحالتين يتكون جزيئ DNA واهب وجزيئ مستقبل به المتنقل Tn3. وبذلك يكون قد تم إنتقال المتنقل. يقوم المثبط بوظيفتين حيث أنه يقلل معدل حدوث الأنتقال للمتنقل والوظيفة الثانية أنه يجعل جزئين Tn3 متقابلين ويقوم بعملية الكسر أى الفصل فى منتصفيهما كما يقوم بأعادة إلتحام مكان الفصل بعد حدوث عملية recombination. ولذلك فإن المثبط يتحكم فى مدى تكرارية حدوث عملية إنتقال المتنقلات ولذلك فإن عملية النقل متحكم فيها ومنظمة تماماً.



خطوات تكوين cointegrate



شكل ٤٦ : خطوات حدوث recombination من الـ cointegrate

تعتبر المتنقلات من أهم أدوات أو وسائل الدراسات الوراثية لما يأتي. أولا يمكن إستعمال المتنقلات كناقلات وسيطة متحركة cloning vehicles، حيث يمكن إدخال

الجين المطلوب بين تتابع النيوكليوتيدات فى المتنقل. يمكن الحصول على أعداد كبيرة جدا من هذا المتنقل المحتوى على الجين المطلوب وذلك بإدخال هذا المتنقل إلى الخلية البكتيرية. يمكن الحصول على هذا المتنقل المحتوى على الجين المطلوب كما يمكن أيضا الحصول على البلازميد من خلايا البكتريا الحاملة له وذلك بفصلها وعزلها وتنقيتها من خلايا البكتريا كما تم شرحه فى جزء البلازميد. يمكن حقن المتنقل بما يحمله أى الجين المطلوب فى الحيوانات وبذلك ينتقل المتنقل المطلوب إلى كروموسوم الكائن ويتحد معه. وقد تم عمل ذلك تماما لتغيير لون العين فى حشرة ذبابة الفاكهة. ثانيا تحدث بعض الأمراض الوراثية نتيجة لتثبيط بعض الجينات بواسطة المتنقلات. ولذلك فإن إزالة المتنقلات تسبب الشفاء من المرض. يمكن أن يكون العكس صحيح حيث أن النشاط الزائد لبعض الجينات overactive genes يسبب بعض الأمراض الوراثية ولذلك فإن إضافة المتنقلات تقلل إلى حد ما من هذا النشاط الزائد للجينات ويتم الشفاء من المرض الوراثى.

يكون تركيب بعض الفيروسات المسببة لحدوث الأورام مشابة لتركيب المتنقلات أى أن تتابع النيوكليوتيدات فى كل منهما متماثل إلى حد كبير. ولذلك فإن دراسة إنتقال المتنقلات والتعرف على ميكانيكية حدوثها يمكن أن يؤدى إلى علاج بعض أنواع مرض السرطان.



الباب الحادي عشر

التحـول البكتـــيرى

Bacterial Transformation

الباب الحادى عشر
التحـول البكتيرى
Bacterial Transformation

التحول البكتيرى هو عبارة عن طريقة فيها الخلية المستقبلة تكتسب جينات من جزيئات دنا حر فى البيئة المحيطة. يمكن عمل ذلك فى المعمل وذلك بواسطة عزل دنا من خلايا واهبة ثم إضافة دنا إلى معلق من الخلايا المستقبلة. يحدث التحول البكتيرى فى الطبيعة. يعتبر التحول البكتيرى أداة هامة لعمل الخرائط الوراثية لبعض الكائنات. علاوة على ذلك فإن القابلية لنقل دنا البلازميد أو الفاج إلى خلية بكتريا مستقبلة يعتبر هام جدا فى الهندسة الوراثية.

إكتشاف التحول البكتيرى
Discovery Of Transformation

إكتشاف التحول البكتيرى كان واحد من أهم الأحداث فى علوم الحياة لأنها تقدم الأساس للوراثة الميكروبية الحديثة والوراثة الجزيئية الحديثة. هذا الإكتشاف قاد إلى إثبات أن دنا عبارة عن مادة وراثية.

مرض الإلتهاب الرئوى البكتيرى فى الثدييات يتسبب عن بعض سلالات البكتريا *Streptococcus pneumoniae*. خلايا هذه السلالات تحاط بواسطة غلاف عديد التسكر والذى يقى البكتريا من جهاز المناعة للحيوان المصاب وهكذا يمكن للبكتريا أن تحدث المرض. عند وجود بكتريا *S. pneumoniae* ممرضة مسببة للمرض تم تنميتها على بيئة آجار مغذى فإن الغلاف يعطى المستعمرة البكتيرية مظهر أملس smooth براق ويرمز لها بالرمز S. بعض السلالات الطفرة من هذه البكتريا تفتقر نشاط الإنزيم اللازم لتخليق عديد السكريات الخاص بالغلاف، وأن هذه البكتريا تكون مستعمرات لها سطح خشن (خشنة rough) ويرمز لها بالرمز R. سلالات R لا تسبب مرض

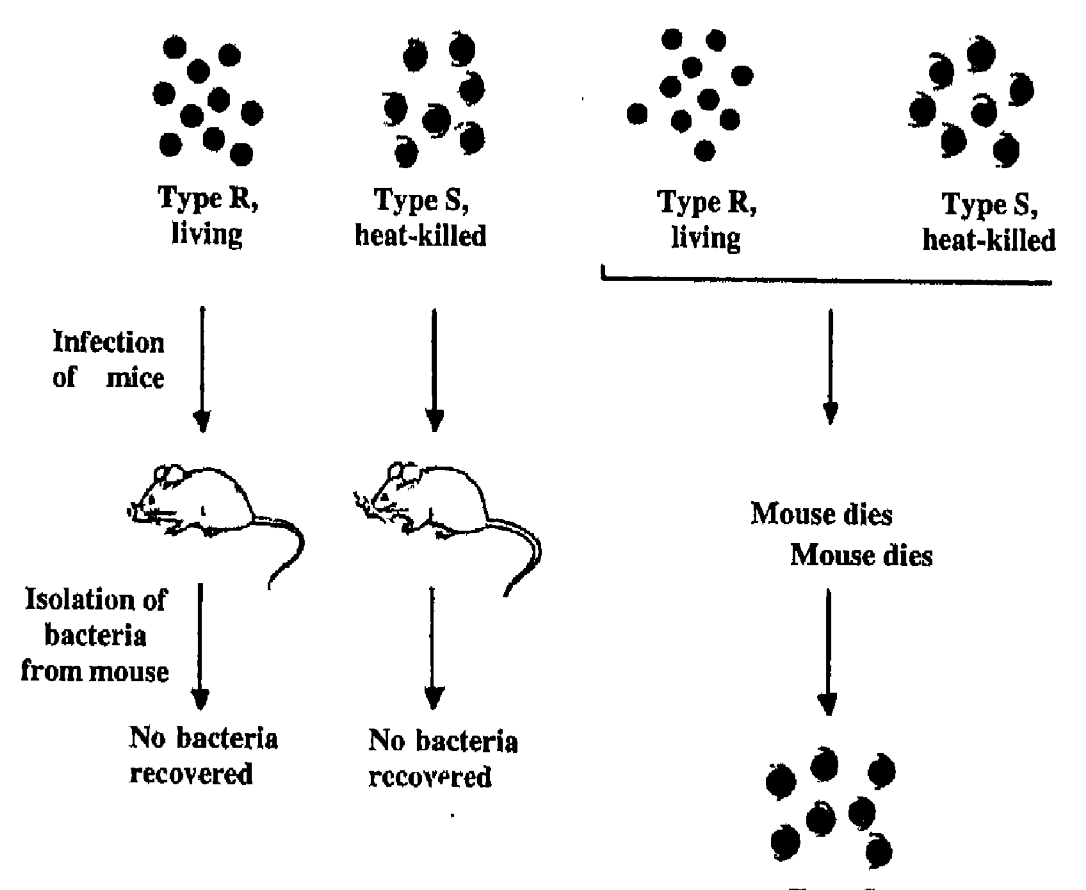
الإلتهاب الرئوى لأنه بدون الغلاف فإن الخلايا تصبح خاملة بواسطة جهاز المناعة للعائل.

كلا من السلالتين R و S لهذه البكتريا تكون صادقة التربية breed true عدا بعض حالات الطفرات النادرة فى السلالات R والتى ينتج عنها تكوين الشكل الظاهرى للسلالات S أى طفرة من R إلى S. والنادر من الطفرات فى السلالات S والتى ينتج عنها الشكل الظاهرى R أى طفرة من S إلى R. لأن الطفرات البسيطة يمكنها أن تسبب إنقلاب أى إنعكاس بين هذين الطرزين S، R ولذلك أمكن التعرف مبكرا جدا أن الشكلين الظاهريين S phenotypes، R يتحكم فيهما أشكال مختلفة للأليلات لوحدة وراثية واحدة different allelic forms of a simple genetic unit. فى عام ١٩٢٨ لاحظ جريفث Griffith ملحوظة هامة وهى أن الفأر الذى حقن بالخلايا R الحية أو حقن بالخلايا S المقتولة بالحرارة يستمر معاف سليم ولكن الفأر الذى حقن بخليط يحتوى عدد قليل من الخلايا R وعدد كبير من خلايا S مقتولة بالحرارة تموت بمرض الإلتهاب الرئوى. البكتريا المعزولة من عينات الدم للفأر الميت نتج عنها مزارع بكتريا S لها غلاف مماثل تماما للخلايا S المقتولة بالحرارة (شكل ٤٧).

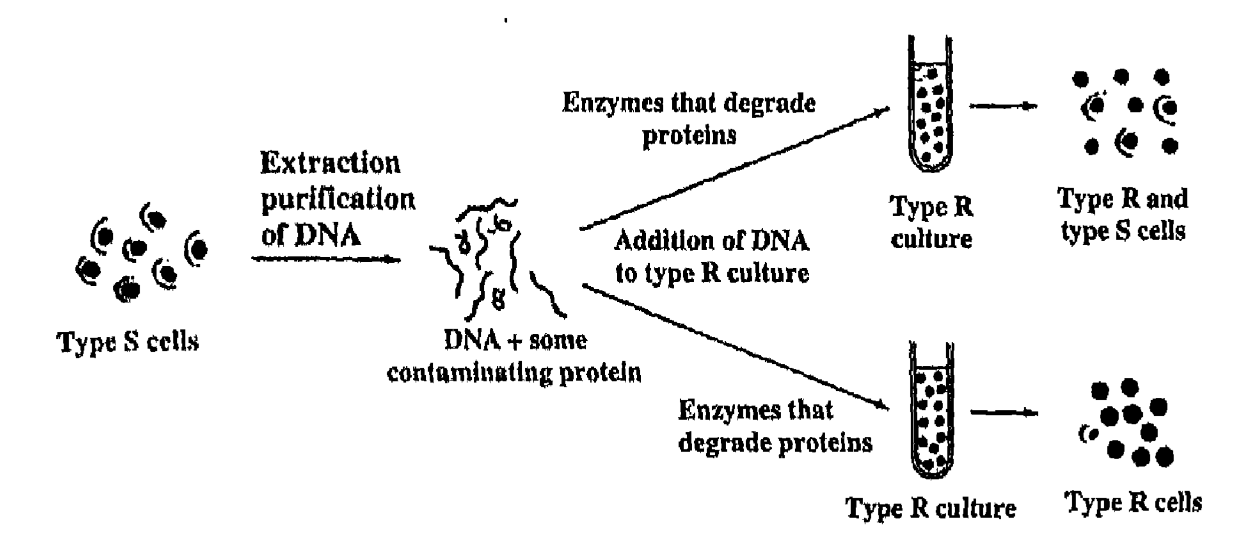
يتضح مما سبق أن الخلايا S الميتة يمكن بطريقة ما أن تمد البكتريا R الحية بالقدرة على مقاومة جهاز المناعة للفأر ونتيجة لذلك تتكاثر وتسبب الإلتهاب الرئوى. علاوة على ذلك المزارع المشتقة من هذه الخلايا التى تغيرت فى صفاتها أى تحولت transformed أى أصبحت محولة أصبحت محتفظة بقدرتها على إنتاج مرض الإلتهاب الرئوى وأصبحت S.

التجارب التالية بعد ذلك وضحت أن الخلايا الحية S يمكن أن يتم إنتاجها فى تكرارية منخفضة أى بأعداد منخفضة عند تنمية الخلايا R فى بيئة سيئة تحتوى خلايا S مقتولة حراريا. علاوة على ذلك، مستخلصات الخلايا S بعد تنقيتها من الخلايا الحية وبعد تنقيتها من البقايا الكبيرة للخلايا والتى أغلبها جدر خلوية وأغشية

وذلك بواسطة الترشيح كانت فعالة تماما كما فى حالة الخلايا S الحية الصحيحة فى تحويل الخلايا R إلى الطراز S. قام كل من Avery، MacLoed، McCarty عام ١٩٤٤ بعمل تجربة حساسة والتى قادت ووضحت فهمنا الحالى لهذه الظاهرة. لقد قاموا بتنقية دنا من خلايا S ووجدوا أن إضافة كميات قليلة من دنا للمزارع النامية من الطراز R ينتج عنها بإستمرار مزارع ملساء براقة وهى تحتوى خلاياها على الغلاف S من عديد السكريات. دنا المستعمل فى تجاربهم كان عبارة عن عينات تحتوى آثار من البروتين ورنا ولذلك سبب تعقيد فى ترجمة النتائج إلى حد ما. نشاط وحدوث التحول لم يتغير بالمعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتين أو بواسطة إنزيم RNase ولكنه دمر تماما بإستخدام DNase (شكل ٤٨). هذه التجارب وأخرى كثيرة أجريت فيما بعد فى السنوات القليلة التالية أثبتت أن المادة المسئولة عن التحول الوراثى هى دنا الخلايا الواهبة وهكذا فإن دنا مادة وراثية.



شكل ٤٧: يوضح تجربة جريفث لإثبات حدوث التحول البكتيرى فى الفأر.



شكل ٤٨ : إثبات أن دنا وليس البروتين هو الجوهر النشط فى التحول البكتيرى

بيولوجيا التحول الوراثى البكتيرى
Biology Of Transformation

يحتاج التحول الوراثى أن تكون الخلايا فى حالة فسيولوجية مناسبة وأيضا حالة إنتخاب مناسب للخلايا وقدرة مناسبة للخلايا.

كيفية تحديد أو إكتشاف التحول Detection of transformation :

حدوث التحول البكتيرى نادر الحدوث وهو يماثل فى ذلك أغلب طرق نقل الجين الأخرى. يمكن تحديد أو إكتشاف حدوث التحول وذلك بالإنتخاب لوراثة الشكل الظاهرى من دنا واهب بواسطة الخلايا المستقبلة. مثال ذلك، عند الحصول على دنا نقى من مزارع البكتيرياس. نيومونيى مقاومة للإرثروميسين ثم خلطها مع مزارع قابلة للتأثر بالإرثروميسين (المقاومة للإرثروميسن Ery^r والحساسة للإرثروميسين Ery^s). بعد فترة من التحضين (وهى فترة مناسبة لإكتساب دنا وأيضا للتعبير عن الشكل الظاهرى phenotypic expression للمقاومة للمضادات الحيوية)، فإن الخلايا تزرع على أطباق بيئة آجار تحتوى إرثروميسين. تكوين مستعمرات مقاومة بتكرار كبير أى بأعداد كبيرة نسبيا للإرثروميسين أعلى من معدل حدوث الطفرات من

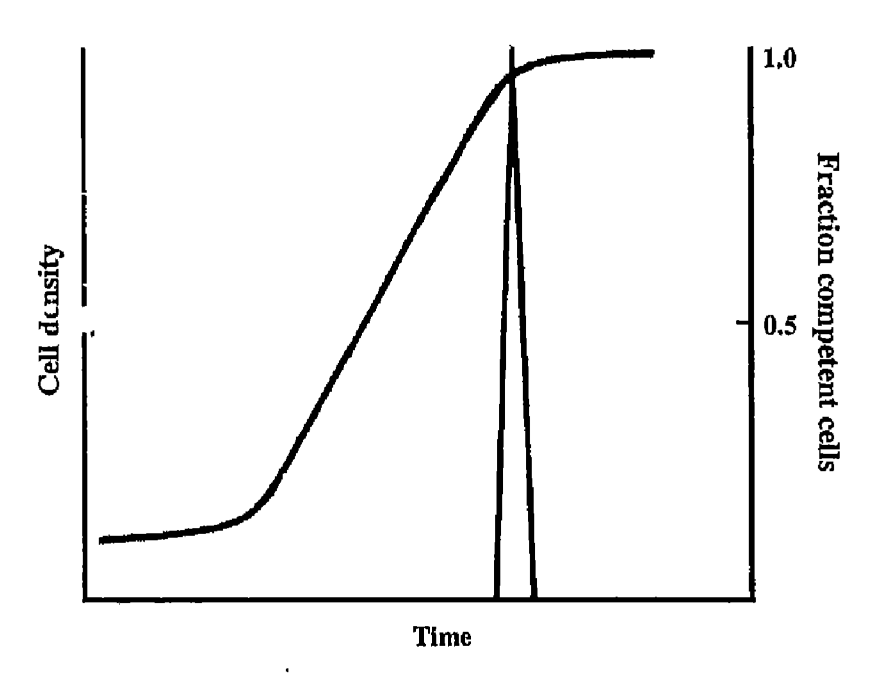
حساسة للإرثروميسين إلى مقاومة للإرثروميسين أى من Ery^{s} إلى Ery^{r} والذى يكون حوالى $١٠^{-٨}$، يشير ذلك إلى أن حدوث التحول لهذه البكتريا قد حدث. لأن نسبة وعدد المستعمرات المقاومة أكبر بكثير من معدل حدوث الطفرات لهذه الصفة ولذلك فالزيادة عن معدل حدوث الطفرات تكون نتيجة التحول البكتيرى. وجد فى حالة هذه البكتريا أن تكرارية أو معدل حدوث التحول البكتيرى لأغلب معلمات أو دلالات المقاومة للمضادات الحيوية antibiotic- resistance markers من ٠,١ إلى ١%.

التنافس أو المقدرة أو القدرة Competence :

يبدأ حدوث التحول البكتيرى بأخذ شظية من دنا (جزء من دنا) DNA fragment (حيث أن الكروموسوم البكتيرى يتكسر بشدة إلى أجزاء متفاوتة الأحجام أثناء العزل) من البيئة المحيطة وذلك بواسطة خلية مستقبلة recipient cell وتنتهى بحدوث تبادل لإعادة الصياغة recombinational exchange بين جزء من دنا الواهب donor DNA أو دنا الخلية الواهبة donor cell مع جزء متوافق متماثل homologous segment من كروموسوم الخلية المستقبلة. من المحتمل أن أغلب أنواع البكتريا قادرة على عمل خطوة إعادة الصياغة recombination step ولكن العكس الصحيح فإن قابلية أغلب البكتريا لأخذ أى إكتساب شظية من دنا بكفاءة عالية تكون محدودة. حتى فى أنواع البكتريا القادرة على التحول البكتيرى فإن حدوث إختراق لدنا للخلية البكتيرية يكون فى عدد قليل من الخلايا فى مستعمرات وعشائر البكتريا النشطة حيويا النامية. تحضين الخلايا لهذه الأنواع تحت ظروف بيئية خاصة ينتج عنه عشيرة من الخلايا تكون قادرة على أخذ شظية دنا بكفاءة عالية نسبيا (تم تنشيط الخلايا لهذا الغرض) ويكون ذلك بدرجة معينة $١٠^{٤}$ إلى $١٠^{-٦}$ by a factor 10^4 to 10^6 أنها تنافسية أو قادرة competent. تختلف الظروف اللازمة لحدوث التنافس أو القدرة من نوع إلى آخر من البكتريا كما يختلف أيضا حالة ونوعية وطور ومرحلة خلايا البكتريا القابلة لحدوث التنافس أو القدرة من نوع إلى آخر فى البكتريا.

بذل مجهود كبير لفهم آلية حدوث التنافس أو القدرة ولكن لازالت الظاهرة بعيدة عن الفهم والوضوح. يظهر أن التنافس يحدث نتيجة للتغيير فى تركيب الجدار البكتيرى ومن المحتمل أنه يكون مرتبط مع تخليق مكونات جدار الخلية عند الخلية عند مرحلة معينة من دورة حياة البكتريا. لتكوين أى لحدوث التنافس فإن وجود المستقبلات receptors من نوع خاص معين لازم، وحيث أن هذه المستقبلات تتكون تلقائيا أو يستحث تكوينها على جدار الخلية، فإن هذه المستقبلات ضرورية لحدوث إرتباط أى إلتصاق أولى initial binding لدنا مع سطح الخلية. عدد المستقبلات النشطة يختلف بدرجة كبيرة من كائن إلى آخر ومن بكتيريا إلى أخرى ومثال ذلك حيث يوجد ٨٠ مستقبل نشط للبكتريا س. نيومونيى، ٥٠ للبكتريا *Bacillus subtilis*، ٤ فى حالة *Haemophilus influenza*. ينشأ التنافس عند مرحلة معينة من نمو المزرعة وهى مرحلة متأخرة للطور اللوغاريتمى late log phase ويعتمد بدرجة كبيرة على بيئة النمو ودرجة تهوية المزرعة. تختلف نوع بيئة النمو وأيضا الظروف الخاصة بنمو البكتريا والتى تسبب حدوث درجة عظمى للتنافس من نوع من البكتريا إلى نوع آخر. فى حالة البكترياس. نيومونيى ينشأ التنافس عند دخول الخلية الطور الثابت stationary phase ولكن حالة التنافس تستمر فقط لدقائق قليلة (شكل ٤٩). ينشأ التنافس أولا فى عدد قليل من الخلايا. يرتبط بالنشوء المبكر للتنافس إفراز هذه الخلايا لواحد أو أكثر من البروتينات تسمى عوامل التنافس أو القدرة competence factors. هذه البروتينات تحول باقى الخلايا فى العشيرة إلى حالة تنافس ومن المحتمل أن يكون ذلك بواسطة بعض التأثيرات المباشرة أو التأثير المباشر على المستقبلات. عوامل التنافس النقية (المنقاة بطرق تحليل دقيقة) يمكنها إنتاج تنافس فى أغلب المزارع وبطريقة معينة. ولا تعتمد فى ذلك بشدة على مرحلة نمو البكتريا فى المزرعة ولهذا فإنه يعتقد أن درجة الحرارة ونوع البيئة ودرجة التهوية وغيرها يتم الإحتياج إليها أولا فقط كزناد trigger لتخليق أو تحرر release عوامل التنافس بواسطة عدد قليل من خلايا البكتريا، وعندما يتم تكوين هذه العوامل التنافسية فإنها

تسبب تنافس لبقية خلايا المزرعة أو العشيرة دون إحتياج للعوامل البيئية السابقة. عوامل التنافس ذات درجة تخصص عالية جدا فإنها تنتج التنافس لنفس نوع البكتريا الناتجة منه أو أنواع قريبة جدا من هذا النوع. والحقيقة أن آلية عمل عوامل التنافس غير معروفة حتى الآن.



شكل ٤٩ : منحنى يوضح موقع وزمن حدوث التنافس فى عشيرة بكتريا س. نيومونيى

عدد الخلايا فى المزرعة التى تكون قابلة لأن تكون متنافسة ومدة حالة التنافس تعتبران معتمدتين على النوع أى أنها تختلف باختلاف النوع. مثال ذلك أن الظروف التى تجعل جميع الخلايا متنافسة فى س. نيومونيى أى درجة التنافس ١٠٠٪ وتستمر حالة التنافس بضع دقائق. وجد أن العكس صحيح حيث أن فى حالة *B. subtilis* درجة التنافس لا تزيد عن ٢٠٪ (عشرون فى المائة من الخلايا فقط متنافسة) ولكن تستمر حالة التنافس عدة ساعات. من الممكن أن تكون عدم قدرة غالبية أنواع البكتريا على عمل التنافس عبارة عن إنعكاس لنقص المعرفة فيما هى المعاملات المناسبة لذلك، أى أننا لا نعرف ماهى المعاملات المناسبة لهذه البكتريا لكى نجعلها متنافسة.

قدرة الخلية على أخذ دنا يمكن إستحثاثها أو تنشئتها أو زيادتها فى سلالات عديدة

مختلفة من البكتريا بإستخدام طريقة كلوريد الكالسيوم لإحداث التحول البكتيرى. سبق شرح هذه الطريقة فى باب سابق. حالة خلايا البكتريا الناتجة بهذه الطريقة أى المعاملة بهذه الطريقة تختلف تماما عن حالة خلايا البكتريا التنافسية الناتجة طبيعيا. بالرغم من أن أى جزيئ دنا مختلف فى حجمه يمكن أن يدخل خلية البكتريا أو بمعنى آخر أن جزيئ دنا يختلف فى حجمه من جزيئ دنا الصحيح الكبير الحجم إلى جزيئ دنا المحطم أى المحلل إلى أجزاء كبيرة ومتوسطة وصغيرة فإن جميع هذه الأجزاء يمكن أن تدخل خلية البكتريا طبيعيا أو بالمعاملة مثلا بكلوريد الكالسيوم، فإنه فى جميع الحالات تكون الأجزاء المكسورة من دنا بعض الأحوال لا تسبب الثبات الوراثى للخلية المنتقلة إليها حيث أن هذا الثبات الوراثى لخلية البكتريا لا يكون إلا فى حالة الجزيئات الصحيحة أى السليمة من دنا مثل دنا البلازميدات والفاجات. آلية أخذ دنا بواسطة خلايا البكتريا المعاملة بكلوريد الكالسيوم تختلف عن آلية أخذ دنا طبيعيا بواسطة خلايا البكتريا.

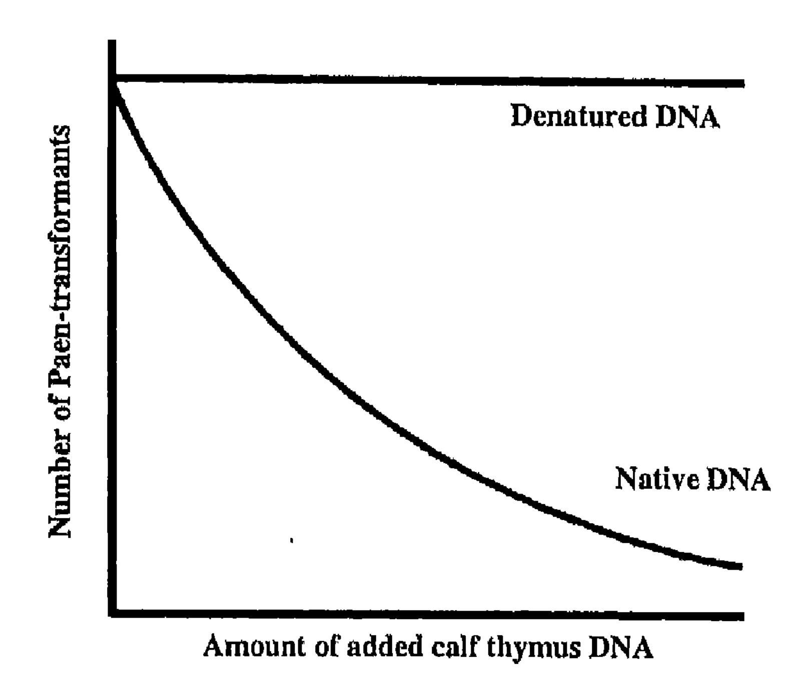
أخذ أو إكتساب دنا DNA uptake:

أخذ دنا بواسطة الخلايا المتنافسة تم فحصه بطريقتين. فى أحد نوعى هذه التجارب فإن الخلايا تم تعريضها لدنا مشع ثم إلى DNase قادر على تحليل دنا تماما. أوضحت هذه التجارب أنه يوجد على الأقل مرحلتين من تفاعل دنا مع الخلايا المتنافسة. الأولى مرحلة إرتباط عكسية مختصرة وفيها يمكن غسيل دنا من الخلايا وفى هذه المرحلة يكون دنا حساس كلية للتحلل بواسطة DNase. والمرحلة الثانية وهى مرحلة غير عكسية فإن دنا لا يمكن غسله من الخلايا ويكون مقاوم لإنزيم DNase. المرحلة الغير عكسية تحتاج إلى طاقة وهى مرتبطة بمرور دنا خلال غشاء الخلية. يمكن أن تسمى الخلايا المتنافسة بالخلايا القادره.

بالرغم من أن حدوث تحول بكتيرى ثابت وراثيا يعتمد ويتوقف بشدة على النوع highly species specific فإن أخذ وإكتساب دنا بواسطة البكتريا يكون غير متخصص

وغير معتمد على النوع. هذه الملحوظة متوقعة لأن جزيئات دنا المختلفة خارج خلية البكتريا من المحتمل أنها تعتبر متماثلة look the same. حيث أن أخذ وإكتساب دنا بواسطة خلية البكتريا لا يمكن تحديده بواسطة التحول الوراثى البكتيرى لأن هذا دنا المكتسب يعاد صياغته أى يلتحم بضعف جدا مع دنا خلية البكتريا. تم عمل إختبار يسمى إختبار التنافس competition assay وبواسطته يمكن إثبات أن جزيئ دنا خاص معين يمكن أخذه بواسطة خلية متنافسة. وفى أحد هذه الإختبارات أو التجارب خلطت عينات مختلفة من بكتريا س. نيومونيى حساسة للبنسلين Pen^s مع كمية ثابتة من دنا معزول من مزارع بكتريا مقاومة للبنسلين Pen^r ومع كميات مختلفة من دنا غده البقر calf thymus. زيادة كميات دنا غدة .البقر قللت من عدد المتحولات (الخلايا المتحولة) المقاومة للبنسلين (شكل ٥٠). دنا الغريب المرتبط بمواقع الإستقبال يثبط تنافسيا أخذ دنا س. نيوموينى. إستثناء من القاعدة، وهى عدم التخصص فى أخذ دنا وجد فى حالة *H. influenza* والتى تأخذ فقط دنا *H. influenza*. واضح أنه لكى يحدث الإرتباط مع سطح الخلية لابد من وجود تتابع خاص من دنا حوالى ١٠ زوج قاعدة bp. عملية التحول فى *H. influenza* وآلية حدوثها على وجه الخصوص تختلف فى هذه البكتريا عن البكتريات الأخرى.

عند دنترة عينات من دنا قادرة على عمل التحول البكتيرى فإنه نتيجة لعملية الدنترة تفقد هذه العينات هذه الصفة وتصبح غير قادرة على عمل التحول البكتيرى. أى أن الدنترة تفسد قدرة عينات دنا على التحول البكتيرى. علاوة على ذلك إضافة عينات من دنا غده البقر calf thymus مدنترة للبكتريا فإنها لاتثبط التحول البكتيرى س. نيومونيى بواسطة دنا س. نيومونيى (شكل ٥٠) ولذلك يبدو إفتراضيا أن دنا وحيد الحلزون ss لا يلتصق بمستقبلات الخلايا المتنافسة. وقد أمكن إثبات ذلك عمليا بإستخدام دنا مشع مدنتر للبكتريا س. نيومونيى أن دنا وحيد الحلزون غير قابل للإلتحام عمليا بمستقبلات الخلايا المتنافسة.



شكل ٥٠: نقص فى التحول البكتيرى فى الخلايا للبكتريا س. نيومونيى الحساسة للبنسلين إلى خلايا للبنسلين وذلك بإضافة كميات مختلفة من دنا غدة البقر الطبيعى **native calf thymus DNA** لكمية ثابتة من دنا س. نيومونيى قابل للتحول البكتيرى. أما فى حالة إضافة دنا غدة البقر المدنتر فإنه لا يحدث إنخفاض فى درجة التحول البكتيرى فى البكتريا س. نيومونيى.

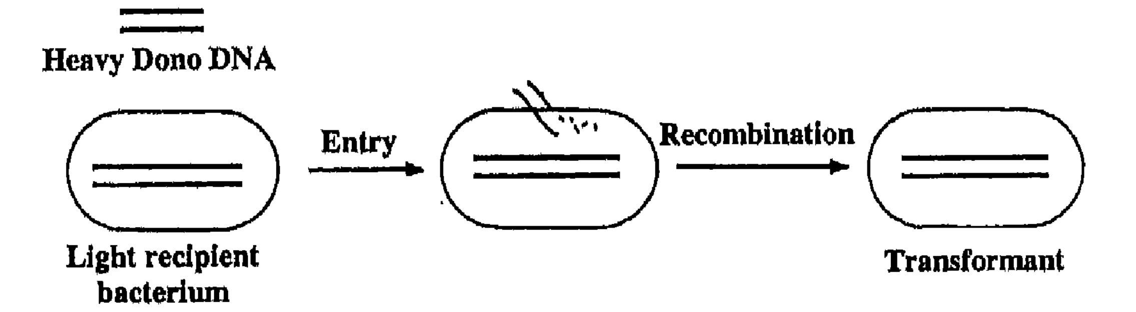
وهكذا فإن دنا المدنترة يكون مسئول عن نقص أخذ دنا بواسطة خلايا البكتريا أى أن الدنترة تسبب قلة أو تثبيط فى أخذ دنا بواسطة الخلايا البكتيرية وقد أمكن إثبات ذلك بواسطة تجارب عكس الدنترة **renaturation** لو أن دنا المدنتر حدث له عكس الدنترة أى أصبح طبيعى **renatured** فإن قدرته على عمل التحول البكتيرى يتم إستعادتها مرة أخرى كما أن قدرته على التنافس مع دنا الطبيعى العادى لحدوث التحول البكتيرى يتم إستعادتها أيضا مرة أخرى.

بإختبار وراثى بسيط أمكن إثبات أن حالة دنا تتغير أثناء أخذها **during uptake** بواسطة الخلايا البكتيرية. مزرعة من البكتريا س. نيمونيى حساسة للإستربتوميسين **Strs** تم تعريفها لدنا تم إستخلاصه من مزارع سلالة مقاومة للإستربتوميسين. بعد ١٥ دقيقة تم غسيل خلايا البكتريا للتخلص من دنا الزائد الغير مرتبط أو ملتحم

بالخلية، وبعد الغسيل تم تقسيم هذه الخلايا إلى مجموعتين. فى حالة المجموعة الأولى فإنه بعد فترة مناسبة وكافية لحدوث تعبير جين الإستربتوميسين وبعد ذلك تم زراعة هذه البكتريا على بيئة مناسبة تحتوى الإستربتوميسين، وقد وجد أن نتيجة النمو هى تكوين عدد جوهرى من الخلايا قد تحول من خلايا حساسة للإستربتوميسين إلى خلايا مقاومة للإستربتوميسين. فى حالة المجموعة الثانية فإنه تم إستخلاص دنا من الخلايا ثم تم إختبار قدرته على تحويل خلايا البكتريا س. نيوميونيى الحساسة للإستربتوميسين إلى خلايا مقاومة للإستربتوميسين، وقد وجد أن التحول البكتيرى للخلايا المقاومة للإستربتوميسين قد حدث بالفعل. من ذلك يتضح أنه فى العينات بعد تعريضها لدنا لمدة ١٥ دقيقة قد حدث فيها بالفعل التحول البكتيرى.

وفى تجارب أخرى مشابهة للتجربة السابقة، فإن خلايا البكتريا تم زراعتها على بيئة مناسبة بنفس الحالة السابقة إلا أن مدة التعريض لدنا هى دقيقتين فقط وليست ١٥ دقيقة كما فى التجربة السابقة ثم تم غسيل الخلايا جيدا. وفى هذه التجربة وجد أن نفس عدد الخلايا والمزارع من البكتريا المقاوم للإستربتوميسين هو نفس العدد فى حالة التجربة ذات ١٥ دقيقة تعريض، ومن ذلك يتضح أن غسيل الخلايا بعد دقيقتين لا يؤثر على عملية التحول البكتيرى. وجد أن دنا المعزول من الخلايا بعد دقيقتين معاملة ليس له قدرة على عمل التحول البكتيرى. دنا النشط فى قدرته على حدوث التحول البكتيرى يدمص ويدخل خلية البكتريا أولا ويستغرق حوالى دقيقتين أو خلال دقيقتين ويكون فى هذه الحالة وفى هذا التوقيت غير نشط فى حدوث التحول البكتيرى ولكن بعد ذلك وقبل ١٥ دقيقة يكون قد تحول إلى دنا نشط فى التحول البكتيرى. والفترة التى يكون فيها دنا الغريب فى الخلايا المتنافسة غير قادر على عمل عملية التحول البكتيرى ويمكن معرفة ذلك بإستخلاصه من هذه الخلايا وإختباره فإنه لن يحدث تحول بكتيرى إلى الزمن الذى يكون فيه قادر على عملية التحول

البكتيرى وهى عبارة عن حوالى العشرة الدقائق الأولى من التجربة تسمى بفترة الخسوف eclipse. أى أن فترة الخسوف هى الفترة التى يكون فيها دنا الغريب الداخل لخلية البكتريا غير قادر على عمل عملية التحول البكتيرى فى خلية البكتريا وهى فترة تكون حوالى عشرة دقائق من بدء المعاملة بدنا. الدراسات الفيزيائية بواسطة دنا س. نيومونيى نشط فى قدرته على التحول البكتيرى مشع وضحت آلية حدوث التحول البكتيرى فى هذا الشأن. يصاحب الإلتحام الغير عكسى لدنا وأخذ دنا irreversible binding and DNA uptake تحليل لحلزون واحد من أحد حلزونى دنا ويكون التحليل بواسطة إنزيم النيوكلييز nuclease الموجود فى مجمع لعديد من البروتينات الموجود فى الغشاء البلازمى للخلية (شكل ٥١).



شكل ٥١: يوضح أحد حلزونى دنا الذى سيأخذ بخلية البكتريا س. نيومونيى تم تحليله وأن الحلزون الآخر تم دخوله فى أحد حلزونى دنا خلية البكتريا، ولذلك فإن خلية البكتريا المتحولة تحتوى على دنا هجين بين كرموسوم البكتريا وبين دنا المأخوذ بواسطة خلية البكتريا وهكذا يكون الكروموسوم البكتيرى فى الخلية البكتيرية معاد صياغته (هجين).

نتائج مماثلة تم الحصول عليها فى حالة البكتريا *B. subtilis*.

كثير من التجارب الفيزيائية توضح أن خيط أى حلزون واحد فقط لدنا هو الذى يدخل خلية متنافسة للبكتريا س. نيومونيى. لم توضح جميع هذه التجارب إذا كان التحليل الجزئى لدنا ضرورى لأخذ دنا أولا. والمدخل العام للإجابة على هذا السؤال هو محاولة عزل طفرات ينقصها عملية التحليل أى غير قادرة على تحليل حلزون من دنا degradation- deficient mutants، ثم تحديد وإكتشاف ما إذا كانت لازالت لها

القدرة على أخذ دنا أم لا. بالفعل أمكن عزل هذه الطفرة على بيئة فى طبق تحتوى دليل ملون color- indicator plate وحيث يحدث تغير فى اللون عندما تلتحم الصبغة أخضر الميثيل dye methyl green بجزيئ دنا. المستعمرات المتكونة على بيئة الآجار المحتوية على كل من صبغة أخضر الميثيل ودنا حر فإن هذه المستعمرات تحاط بواسطة حلقة تختلف فى لونها عن بقية الآجار. ينتج هذا الإختلاف فى اللون نتيجة إفراز إنزيمات محللة لدنا DNases بواسطة الخلايا البكتيرية الهرمة (أى الشيخوخة) فى المستعمرات البكتيرية البالغة. يسبب إنزيم محلل دنا DNase تحليل دنا فى الآجار ومسببا تغيير فى لون أخضر الميثيل تبعا لذلك فى منطقة التحليل أى فى منطقة الصبغة الخالية من دنا.

عند زراعة مزرعة من البكتريا س. نيومونيى مطفرة على أطباق بها بيئة آجار محتوية على دنا مرتبط بالصبغة الخضراء، فقد وجد أن بعض المستعمرات لا يوجد حولها حلقة مختلفة فى اللون. هذه الطفرات N¯oz نوز سالب. وضح التحليل الكيماوى للخلايا نوز سالب أنه ينقصها إنزيم نيوكلييز خاص معين موجود فى الغشاء البلازمى لخلية البكتريا ولذلك فإنها غير قادر على تحليل دنا المتحول أى المراد أخذه بالخلية إلى حالة دنا وحيد الحلزون أى الخيط ss، وأن هذا الدنا لا يمكن أخذه بواسطة خلايا البكتريا. خواص هذه الطفرات توضح بشدة أن تحليل شريط أى خيط أى حلزون واحد من حلزونى دنا ضرورى لأخذ دنا داخل خلية البكتريا وذلك فى حالة البكتريا س. نيومونيى.

فى حالة *H. influenza* توجد فترة خسوف وأن أخذ دنا لا يصاحبه تحليل دنا كما فى الحالة السابقة. كثير من الدراسات أثبتت أن آلية التحول البكتيرى الطبيعى *H. influenza* وهى بكتريا سالبة لصبغة جرام تختلف تماما عن آلية التحول البكتيرى الطبيعى فى البكتريا الموجبة لصبغة جرام.

الآلية الجزيئية للتحول

Molecular Mechanism Of Transformation

فى محاولة لفهم التحول فى البكتريا س. نيومونيى، توجد آليتين ممكنتين يمكن أخذهما فى الإعتبار:

١ - الأليل الموهوب أى الواهب أى الأليل المنقول من الواهب يحل محل أليل المستقبل أى أنه يحدث إحلال وإستبدال لدنا **DNA substitution**.

٢ - شظية دنا المحتوية على الأليل الموهوب أى أليل الواهب يتم إضافتها إلى جينوم المستقبل (الطاقم الوراثى للمستقبل) وذلك بإدخالها بالقرب من أليل المستقبل وهكذا يحدث تضاعف للجين (ثنائى جزئيا **partial diploid**).

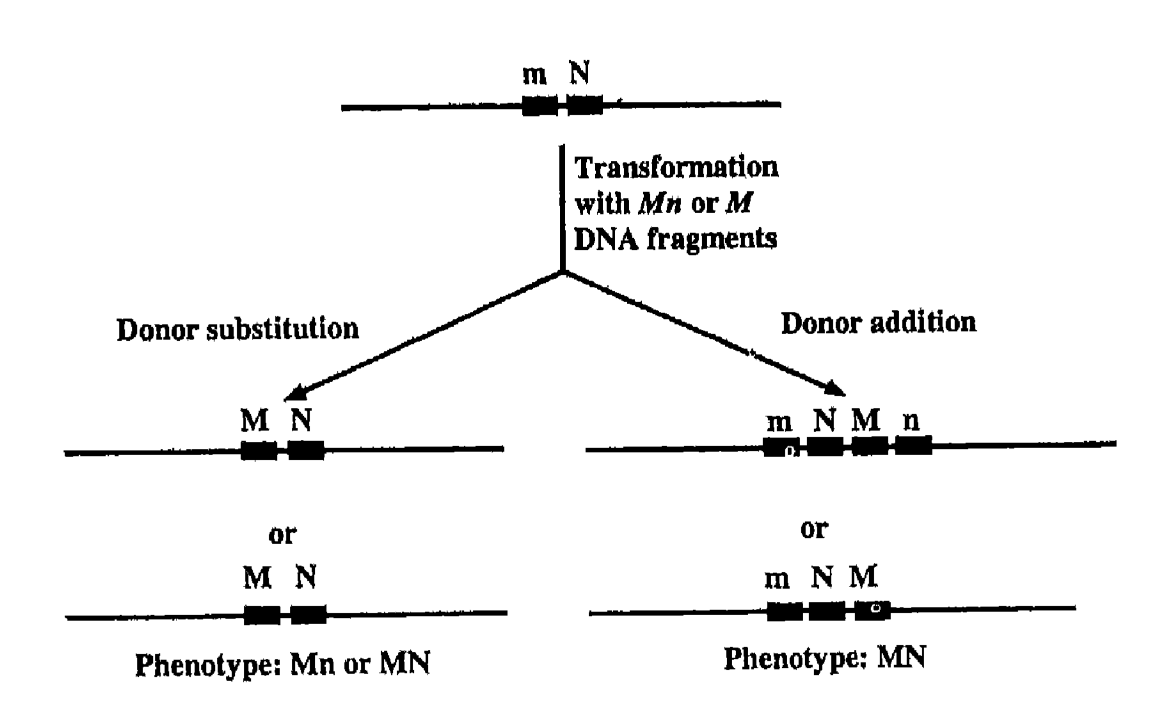
الآلية الأولى تم إثباتها بدراسة التحول البكتيرى العكسى **reciprocal transformation** (التحول العكسى أى يمكن حدوثه فى إتجاهين). أولا، سلالة -x تم تحويلها بواسطة دنا ناتج عن سلالة تحمل أليل سائد +x. ثم تم تعريض السلالة x^+ المتكونة حديثا لدنا من سلالة -x، فقد وجد أن المتحولات x^- **transformation** تنشأ بنفس التكرارية التى نشأت بها المتحولات x^+ فى التجربة الأولى. لو حدثت إضافة دنا فإن المتحول الإبتدائى **initial transformant** لابد أن يحتوى التركيب الوراثى x^+x^-. لو أن دنا من هذا المتحول إستعمل كواهب فإن شظية دنا متحولة ستحمل بإستمرار كلا من الأليلن x^+ و x^- ولذلك فإن الخلايا x^- ستكون نادرة جدا فى التحول الثانى. ومن ذلك يتضح أن إضافة دنا لا تحدث فى التحول البكتيرى.

نوع آخر من التجارب يستخدم معلمين مرتبطين بشدة **two closely linked markers** لتوضيح هذه الحالة. فى هذه التجربة تحتوى البكتريا المستقبلة (تسمى **recipient 1**) على موقعين مرتبطين عن قرب أى قريبين من بعضهما m، n وهما خاصين بالحساسية للمضادات الحيوية. أما البكتريا الواهبة فهى مقاومة لكلا

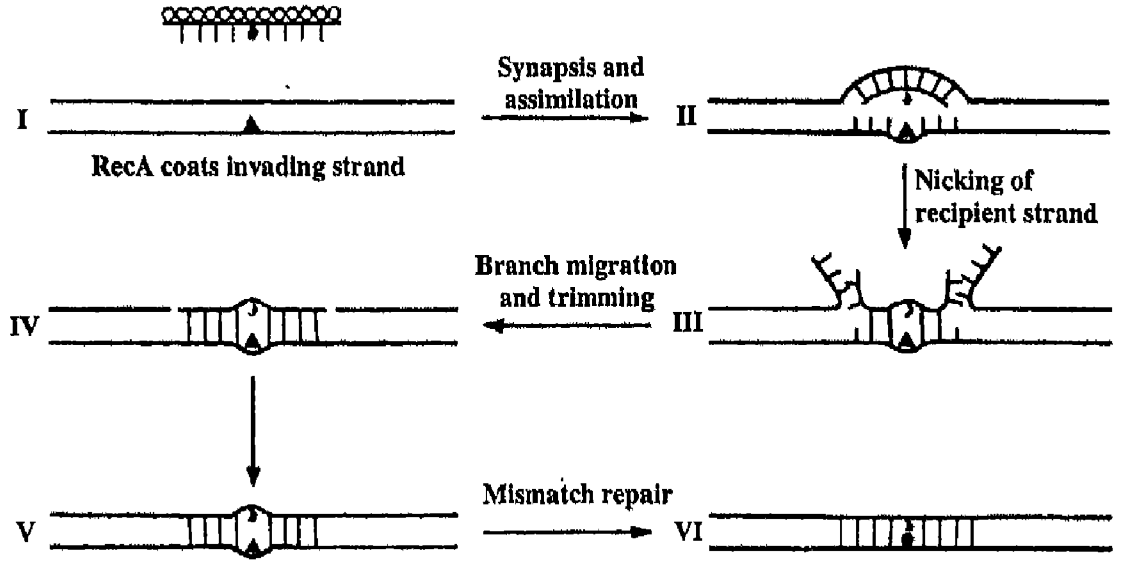
المضادين الحيويين وهى تركيبها MN. ثلاثة تراكيب وراثية وهى Mn، nM، MN وجدت بنفس التكرار تقريبا والتى توضح أن M، N مرتبطين ببعضهما (تحمل عادة على نفس جزيئ دنا). وفى تجربة ثانية، خلايا واهبة لها التركيب الوراثى Mn قد إستخدمت لتحويل خلايا مستقبلة تركيبها mN ويختار M كمعلم، لو أن آلية التحول البكتيرى هى عبارة عن إضافة الواهب donor addition فإن التركيب الوراثى للخلايا المستقبلة سيكون MmN وأيضا MmNn وكلاهما سيظهر الشكل N (شكل ٥٢). ولكن وجد أن المستعمرات الناتجة لها الشكلين الظاهريين Mn، MN. MN and Mn Phenotypes وكلاهما بنفس التعداد وتقريبا أى أن النسبة هى ١:١ تقريبا، وهذا يؤيد نظرية الإحلال substitution أو فكرة الإحلال للجينات ويدحض فكرة الإضافة للجينات addition (شكل ٥٢). وهكذا يوضح أنه يحدث إحلال للجين N فى الخلايا المستقبلة بالجين n الخاص بالخلايا الواهبة على نفس جزيئ دنا الخاص بالمعلم M وهذا يؤيد فكرة الإحلال ويدحض فكرة الإضافة.

وكما تم ذكره سابقا، فى حالة التحول البكتيرى س. نيومونيى، فإن أخذ دنا المتحول بواسطة الخلية يحدث ولكن بشرط هضم أحد حلزونى دنا وتبعا لذلك فإن حلزون واحد يكون قابل للتفاعل available for interaction مع دنا المستقبل. الحلزون المفرد، بطريقة غير معروفة، يتم حمايته من الهضم بواسطة إنزيم النيوكلييز nulease attack– ومن المحتمل يتم تغليفه بواسطة نفس البروتين (بروتين SSB) والذى يستخدم للمحافظة على مناطق وحيدة الحلزون فى شوكة التضاعف replication fork. وضحت التجارب الفيزيائية وفيها يتم إستخدام دنا معلم عال الكثافة (ثقيل) high density- labeled لتحويل بكتريا يكون فيها دنا له كثافة منخفضة (خفيف)، وضحت أن حلزون مفرد من دنا الواهب أو جزء منه يتم إدخاله على هيئة شريط أى حلزون مفرد من دنا الواهب أو جزء منه يتم إدخاله على هيئة شريط فى دنا المستقبل (شكل ٥٣). بمساعدة بروتين بكتيرى مماثل لبروتين RecA

فى البكتريا إ. كولاى، فإن هذا البروتين يسهل ويساعد عملية إزدواج DNA pairing فى عملية إعادة الصياغة recombination. الشظية أو الجزء وحيد الحلزون الداخل يسبب عدم لف unwinding موضعى للكروموسوم المستقبل، وذلك إفتراضيا بواسطة الطرف '5. بواسطة آلية غير معروفة، يتم قطع الشريط أى الحلزون المفرد فى دنا المستقبل. عدم إلتفاف دنا المستقبل يستمر عند طرف دنا المتكون assimilated DNA وبذلك يسمح لجزء من دنا الغازى لكى يزدوج أى يحدث تزاوج للقواعد بين دنا الشريط الغازى مع دنا الشريط أو الحلزون المستقبل وهكذا تستمر هذه الحالة من الإزدواج pairing وتزداد فى الطول بين دنا الشريط الغازى مع دنا الحلزون المستقبل (شكل ٥٣) هذه الحالة من الأزدواج لكى تحدث كما سبق وصفها يمكن أن تسمى هجرة الفرع branch migration (شكل ٥٣)



شكل ١٨٦: تجربة توضح أن التحول البكتيرى يحدث بإحلال الجينات وليست بإضافة الجينات. فيها الخلايا المستقبلة mN والخلايا الواهبة Mn فقد وجـــد من ناتج التجربـــة أنه بالنسبة للشكل الظاهرى M يكون هو Mn أ، MN يدل علـــى حـــدوث الإحـــلال للجينات.



شكل ٥٣: تكامل دنا واهب وحيد الحلزون ss (إعادة صياغة) بواسطة التحول البكتيرى.

وهى عبارة عن عملية تشمل عدة خطوات وهى وجود إنزيمات نيوكلييزات تشذب trimming الأطراف ولذلك تسمى النيوكليوتيدات المشذبة trimming nuclease وهى تتميز بأنها فى آن واحد تزيل الأطراف الحرة من جزيئ دنا والتى قد توجد على كل من دنا الواهب والمستقبل وفى النهاية فإن ليجيز دنا DNA ligase يلصق ويلحم أماكن الكسر أى الفراغات بين دنا المستقبل ودنا الغازى، ونتيجة لذلك يتم تكوين منطقة غير متوافقة أى heteroduplex region وهى منطقة تحتوى عدم تزواج بين القواعد لعدم التوافق بينها mis matched base pair أى زوج قواعد سيئة التقابل. ناتج هذه العملية - سواء أن معلم الواهب ظهر فى النسل أو لم يظهر- يتوقف على حدوث أو عدم حدوث إصلاح لهذا التزاوج المفقود بين القواعد mismatch repair (إصلاح التقابل السيئ)، وسواء حدثت إزالة للقواعد الغير متزاوجة أى الغير متوافقة فى الواهب أو المستقبل أو لم تحدث الإزالة وضحت بعض المعلمات والتى تعرف بأنها عالية الفاعلية high-efficiency markers أن الإصلاح للتقابل السيئ للقواعد يتم عادة ولكن قد يحدث الإصلاح بقلة أو قد لا يحدث. وفى الحالة الأخيرة ونتيجة لتضاعف الكرموسوم وإنقسام الخلية فإن أحد الخليتين لها التركيب الوراثى للواهب والخلية الأخرى لها التركيب الوراثى للمستقبل recipient genotype. ولأن الطرق

المستخدمة للكشف عن مزارع البكتريا فى البيئات أى عن سلالات البكتريا فإنها تعتمد أساسا أنها تسمح بنمو الخلايا والمزارع والسلالات من البكتريا المعاد صياغتها فقط (ومن أمثلة ذلك أن المضاد الحيوى تم إضافته أو أن الحامض الأمينى الذى تحتاج إليه البكتريا غير موجود فى البيئة) ولذلك المزارع والمستعمرات النامية تكون لبكتريا معاد صياغتها فقط. وفى حالة المعلمات قليلة الكفاءة فإن الإصلاح للتقابل السيئ ينتج عنه عادة إزالة القاعدة الغير متزاوجة أى الغير متوافقة mismatched pair من دنا الواهب ولذلك فإن الخلية يكون تركيبها الوراثى هو التركيب الوراثى للمستقبل. لأثبات ذلك بالنسبة لكلا النوعين من المعلمات عالية الكفاءة وقليلة أو منخفضة الكفاءة فإنه تم حدوثه نتيجة لعزل طفرات من البكتريا س. نيومونيى تسمى ¯Hex والتى تتميز بأن لها درجة كبيرة من الطفرات التلقائية spontaneous mutations. هذه الطفرات يبدو أن لها نشاط عادى وسرعة عادية فيما سبق وصفه وهو natural editing activity وأيضا عملية إدخال مجموعة الميثيل لدنا تحدث بسرعة طبيعية ولذلك يعتقد أنها تنقصها إصلاح التقابل السيئ mismatch repair. عند حدوث تحول بكتيرى للطفرات ¯Hex فإنه يبدو أن جميع المعلمات تبدو وكأنها تتحول بكتريا لتصبح مثل المعلمات عالية الكفاءة، ومن المحتمل أن ذلك يحدث لأن واحد من الخليتين البنويتين بعد الإنقسام الخلوى تحتوى دائما على التركيب الوراثى للواهب.

عمل الخرائط بواسطة التحول البكتيرى
Mapping By Transformation

يعتبر التحول البكتيرى هو الطريقة الوحيدة الممكنة لعمل الخرائط الكروموسومية فى بعض الأنواع. عامة الأساس فى بعض الخرائط الكروموسومية هو قياس تكرارية إعادة الصياغة recombination frequencies بين المعلمات. ولكن فى التحول البكتيرى فإن عديد من التأثيرات تجعل قياس هذه التكرارية طريقة لا يمكن الإعتماد عليها. المشكلة الرئيسية هى إحتمال الشفاء لمعلم الواهب فى مستقبل يعتمد أساسا

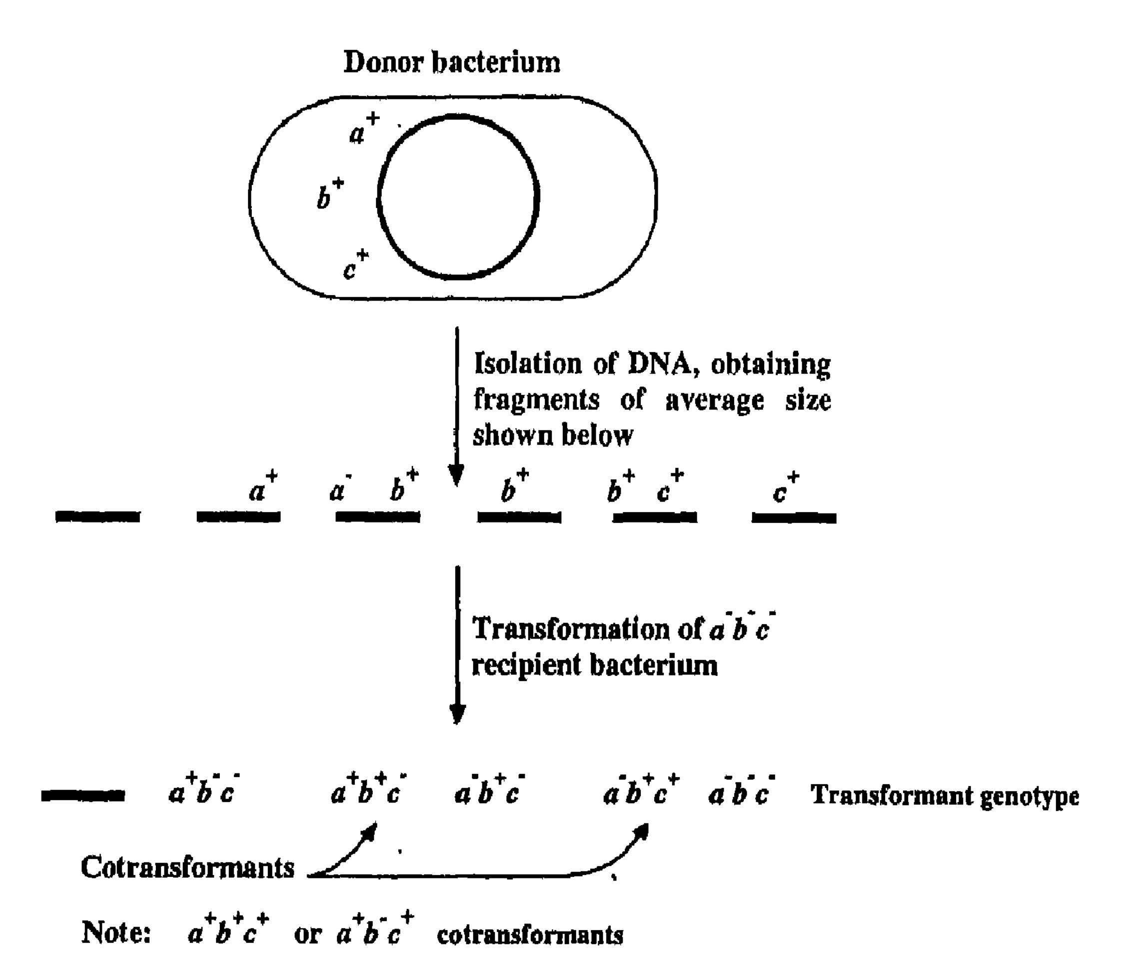
على الوزن الجزيئى لشظية دنا الواهب وأكثر أهمية من ذلك نوع المعلم ذاته. فى الجزء السابق أتضح كيف يمكن التمييز بين المعلم منخفض الكفاءة والمعلم عال الكفاءة. ولأن هذا التمييز بين النوعين يتوقف على إحتمال حدوث إصلاح التقابل السيئ للقواعد فى إتجاه معين والذى من المحتمل أن يتحكم فيه تتابع القواعد المعينة المحلية local base sequences وعوامل أخرى. عامة الأليلات المختلفة لنفس الجين يكون لها تكراريات مختلفة different frequencies. علاوة على ذلك فإن التحول العكسى أو التحولات البكتيرية العكسية reciprocal transformations لا ينتج عنها نفس التكراريات للأليلات ومثال ذلك فإن التحول البكتيرى للأليل Z^- للسلالة الواهبة عند إنتقاله إلى سلالة مستقبلة فيها الأليل -z فإنها لا تحدث بنفس التكرارية عند تحول أليل z^- واهب إلى سلالة Z^- مستقبلة وذلك للإختلاف فى الإصلاح السيئ التقابل للقواعد mismatch repair. من الواضح، أن هذه العوامل أو التأثيرات تسبب أن تكون تكرارية إعادة الصياغة بين معلم سلالة واهبة وبين معلم مستقر قريب nearby resident marker هى نتيجة عوامل أخرى خلاف المسافة بين المعلمين أو المعلمات، ولذلك فإن تكرارية إعادة الصياغة لا ينتج عنها خريطة معبرة.

يتوقف عمل الخرائط بواسطة التحول البكتيرى على القاعدة أو المبدأ، أن معلمين يتحولان سويا عندما يكونان قريبان من بعضهما بمسافة كافية وتحملان على شظية واحدة لدنا أى نفس الشظية. عند عزل دنا من خلية بكتريا واهبة فإن الكروموسوم الواحد يتكسر إلى عدة مئات من الشظايا الصغيرة. بإستخدام خلايا قادرة بدرجة عالية من السلالة المستقبلة وفى وجود زيادة من دنا فإن التحول البكتيرى لأغلب الجينات يحدث بتكرارية حوالى خلية لكل $١٠^{٣}$ خلية. لو أن جينين y، z^- متباعدان عن بعضهما على الكروموسوم الواهب ولذلك فإنهما يحملان دائما على شظيتين مختلفتين من دنا، وعند تثبيت تركيز دنا الكلى، فإن إحتمال حدوث تحول بكتيرى تلقائى مزدوج simultaneous transformation (cotransformation) لمستقبل تركيبه y^-z^- إلى الحالة البرية يكون تقريبا مربع هذا العدد أو بعبارة أخرى يكون

واحد أى عدد واحد متحول تركيبه y^+z^+ لكل ١٠^٦ خلية مستقبلة. لو أن جينين قريبين من بعضها على الكروموسوم وبحيث أنهما يوجدان معا على شظية واحدة عادة فإنه يكون التحول البكتيرى التلقائى المزدوج **cotransformation** يكون تقريبا مماثل تماما لحالة التحول البكتيرى لجين واحد فقط أو بعبارة أخرى تقريبا خلية برية واحدة ناتجة عن التحول لكل ١٠^٣ خلية مستقبلة. وهكذا فإن التحول التلقائى المزدوج **cotransformation** بتكرارية عالية عن تكرارية التحول البكتيرى لناتج جينين منفصلين توضح وتثبت وتكون شاهد على أن المسافة بين الجينين تحت الدراسة تكون صغيرة وأن الجينين متقاربين. ومثال ذلك لو أن الجينات z، y، x مطلوب دراسة مواقعها بالنسبة لبعضها، ووجد أن الجينين z، y يمكن أن يحدث لها تحول تلقائى مزدوج **cotransformed** وأن الجينين z، x يمكن أن يحدث لهما تحول تلقائى مزدوج **cotransformed** ولكن الجينين y، x لا يحدث لهما تحول تلقائى مزدوج **cannot be cotransformed** أو يحدث لهما تحول تلقائى مزدوج بتكرارية منخفضة جدا أى نادرة فإن ترتيب الجينات يكون y ثم z ثم x (شكل ٥٤).

إستخدام تكرارية التحول التلقائى المزدوج **cotransformation** فى عمل الخرائط الكروموسومية لا يكون دائما سليم أو دوغرى أو بدون إستثناءات أى يوجد شواذ لذلك **not always straightforward**. مثال لذلك، أنه عندما تكون فى عشيرة من خلايا البكتريا، جميع أو أغلب خلايا البكتريا غير قادرة **non competent**، فإن وجود تكرارية للتحول بدرجة عالية يكون غير كاف لإثبات أن المعلمين مرتبطين. يمكن شرح ذلك فى المثال التالى. يوجد معلمين وهما y، z وكل منهما يحدث له تحول بكتيرى بتكرارية خلية واحدة متحولة لكل ١٠٠ خلية مستقبلة أى أن التكرارية ١٠^-٢ (**frequency= 10^{-2}**) لو أن y، z غير مرتبطين فإن إحتمالات التحول أى تكرارية التحول أو بعبارة أخرى هى خلية واحدة فيها تحول تلقائى مزدوج **cotransformant** لكل ١٠^٤ خلية. لو إفترضنا أنه فى تجربة خاصة أن ٥% فقط من خلايا العشيرة متنافسة. فى هذه الحالة يكون التحول للجين الواحد مرتفع عن القيمة ١٠^-٢ ولكن

الحقيقة تكون حالة واحدة لكل خمسة خلايا متنافسة أي أن التكرارية الحقيقية تكون ٠,٢ . فى غياب الإرتباط، فإن القيمة المتوقعة لتحول بكتيرى مزدوج double transformants يكون (٠,٢) (٠,٢)= ٠,٠٤ أى حالة متحول لكل ٥٠٠ خلية من مجموع خلايا العشيرة البكتيرية. وهكذا فإن العدد المتوقع للتحول البكتيرى المزدوج الذى يحدث عشوائيا يكون فقط ١/٥ خمس عدد التحول البكتيرى المفرد.



شكل ٥٤: التحول البكتيرى التلقائي المزدوج لمعلمات مرتبطة cotransformation of linked markers المعلمات a، b قريبة من بعضها تماما ولذلك عادة توجد على شظية واحدة وتماما كما فى المعلمين b، c. ولكن العكس صحيح المعلمين a، c غـــير متقـــاربين. ولذلك يكون ترتيب الجينات a ثم b ثم c.

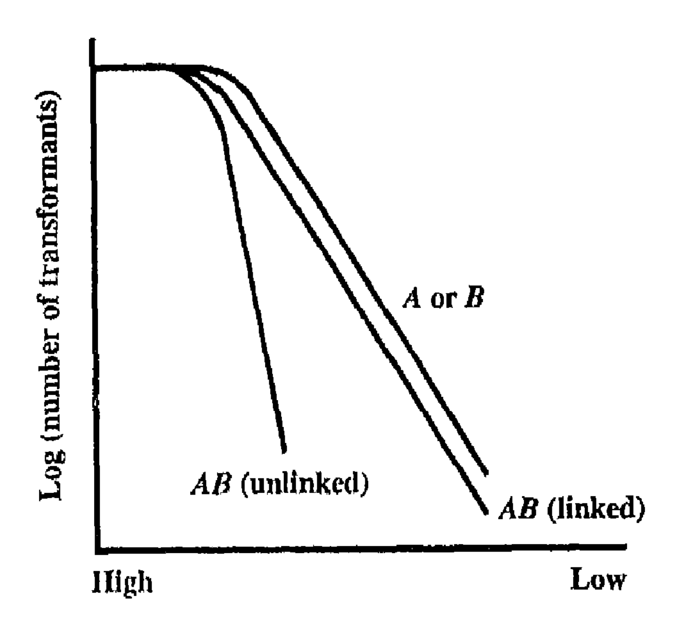
لو أن التحول المزدوج وجد بنسبة ١/٥٠٠ أى ٠,٠٠٢ لأن ١/٥٠٠= ٠,٠٠٢ فإن هذه النسبة أو هذه التكرارية كبيرة مقارنتها بالقيمة ١٠^-٤ وهذه هى النتيجة المتوقعة عندما تكون كل خلايا البكتريا متنافسة، ولذلك يمكن القول أن التحول

المزدوج ينشأ نتيجة التحول البكتيرى التلقائى المزدوج cotransformation. والحقيقة هنا التى تقول أن عدد التحول التلقائى المزدوج cotransformants يكون ١/٥ عدد التحول المفرد single transformants، لا تكون الحقيقة مدعاة للشك أو للجدل لأن جزيئات دنا تتكسر أى تتجزأ إلى شظايا أى أجزاء صغيرة عشوائيا وبالتالى فإن بعض الشظايا فقط وليست جميعها هى التى تحمل كلا المعلمين أى كلا الجينين ونتيجة لذلك يحدث التحول التلقائى المزدوج. وهكذا، فى حالة عندما يكون التنافس فى الخلايا غير مرتفع فإن بعض الإختبارات يحتاج إليها لكى توضح أن قيم نتائج التحول البكتيرى تعبير عن الإرتباط حقا. من أهم الإختبارات الموضحة لذلك هى إختبار التخفيف dilution test. فى حالة عشيرة من الخلايا فإن تكرارية التحول البكتيرى الكلى لمعلم مفرد تكون دالة لتركيز دنا، ولذلك فإنه عند إضافة جزيئات قليلة من دنا إلى مزرعة البكتريا فإن يوجد عدد قليل من الخلايا المتحولة. يحدث إنخفاض فى تكرارية التحول البكتيرى على هيئة مستقيم direct linear function تبعا لتركيز دنا (عدا فى حالة التركيزات المرتفعة جدا من دنا وحيث تكون الخلايا مشبعة). وهكذا فى حالة التحول البكتيرى للمعلمين y، z فإن سرعة إنخفاض تكرارية التحول البكتيرى لكل من z أو y تبعا لإنخفاض تركيز دنا ستكون متساوية (شكل ٥٥) فى حالة إرتباطهما أو فى حالة كل منهما منفرد غير مرتبط.

لو أنه لا توجد شظايا لدنا تحمل كلا المعلمين مرتبطين فإن إنتاج خلايا متحولة تحتوى كل من z، y وتسمى الخلايا المتحولة yz transformants yz تعتمد أساسا على مدى تفاعل الخلية مع كل من شظايا دنا الحاملة y وشظايا دنا الحاملة z. فى هذه الحالة إنخفاض قدرة ١٠ مرات فى تركيز دنا سيقلل من إحتمالات التفاعل المزدوج بدرجة factor= $١٠^{٢}$ ولذلك فإن المنحنى الخاص بذلك سيحدث له إنحدار بدرجة شديدة.

عند عمل خرائط بالتحول فإنه توجد ظاهرة هامة وهى أنه يمكن التحكم فى حجم شظايا دنا المعزولة، وهكذا فإن إحتمالات نقل جينين مع بعضهما cotransformation

of two genes يمكن أن يكون لها علاقة بمتوسط الوزن الجزيئى لدنا الواهب. وتبعا لهذه العلاقة يمكن عمل خريطة فيزيائية من بيانات التحول البكتيرى، ومثال ذلك بقياس تعدد التحول البكتيرى لجينين cotransformation كدالة أو مقياس للوزن الجزيئى لدنا المتحول بكتيريا فإنه يمكن تقدير المسافة التى تفصل الجينين تقريبا. تكرارية التحول البكتيرى لأى جين تقل لأن الشظايا الصغيرة يحدث لها تشذيب (شكل ٥٣) trimming وقد ينتج عنه تحطيم الجين فى دنا الواهب. هذا النقص الناتج عن التشذيب لا يحدث إلا فى حالة نقص متوسط الوزن الجزيئى لدنا ٥ × ١٠°. لو أن تعدد أى عدد مرات نقل الجينين أو أكثر سويا يقل كلما صغر حجم الشظايا فإنه يمكن القول أن المعلمات التى تنقل بالتحول البكتيرى مرتبطة ببعضها.



شكل ٥٥: إختبار التخفيف للتحول التلقائى المزدوج A dilution test for cotransformationفى حالة عندما يكون A، B مرتبطين فإن الإنخفاض فى تكرارية التحول التلقائى المزدوج تبعا للإنخفاض فى تركيز دنا بنفس السرعة والمعدل فى حالة عندما يكون الجينين مستقلين منفردين A أو B. لو أن الجينين غير مرتبطين فإن الإنحدار أى الإنخفاض يكون بدرجة أكبر أى بشدة.

فى كثير من أنواع البكتريا، ينتج عن التحول البكتيرى خريطة ذات معلومات قليلة أى ذات حد أدنى من المعلومات الوراثية minimal genetic map والتى تقدم

معلومات قليلة عن ترتيب وتنظيم الجينات gene organization. تكمن المشكلة فى أن عديد من البكتريا مثل *S. pneumoniae*، *H. influenza* تنمو فقط على بيئة مركبة، ولذلك فإن المعلمات الوراثية الوحيدة المتوفرة هى المقاومة للمضادات الحيوية وقليل من المعلمات التى تختص بالتحول الغذائى لعديدات التسكر. يختلف الوضع فى حالة *B. subtilis* والتى تنمو جيدا على بيئة الحد الأدنى. علاوة على ذلك، فإنه يمكن الحصول بسهولة على طفرات خاصة بالتغذية nutritional mutants كما أنها تصاب بعديد من الفاجات ولذلك يمكن إستخدام معلمات مقاومة phage-resistant markers. عدة مئات من المعلمات معروفة فى حالة ب. ستلس. حتى مع إستخدام ب. ستلس فإنه تنشأ مشكلة عند إستخدام ترافق جينين أو أكثر فى أثناء التحول البكتيرى cotransformation لعمل الخرائط. تنشأ المشكلة من أن الكروموسوم البكتيرى يتجزأ أثناء العزل وأن حجم شظية دنا الواهب تحدد حجم المنطقة التى يمكن فحصها. وهكذا فإن خرائط cotransformation.

(cotransformational mapping) ينتج عنها مجاميع إرتباط محددة مميزة، إنه يمكن للبكتريا ب. ستلس أن تتحول تحول بكتيرى بواسطة دنا له متوسط وزن جزيئ حوالى ٢٥ × ١٠^٦. وهذا الجزيئ من دنا يحتوى عدد يصل إلى حوالى ٣٠ جين ولكن بعض من ذلك ينتج معلمات وراثية (مثال ذلك أن أغلب الطفرات لا يمكن التعرف عليها بسهولة بواسطة إختبارات الأطباق plating tests). هذا الجزيئ من دنا أى الشظية يكون حوالى ١٪ من حجم الطاقم الوراثى للبكتريا ب. ستلس، ولذلك فإن كل شظية تعطى معلومات عن عدد قليل من الجينات فى منطقة صغيرة من الطاقم الوراثى. يحدث تحطيم وتجزيئ للكروموسوم أثناء العزل عشوائيا ولذلك فإن المنطقة من الكروموسوم الموجودة فى شظية يحدث لها تداخل overlapping مع المناطق الموجودة فى شظايا أخرى. لو أن المعلمات الوراثية موزعة بإنتظام على الكروموسوم فإن هذا التداخل من شأنه عمل وتحديد مجموعة إرتباط مفرده. لو أنه

يوجد مناطق من الكروموسوم لا تزيد فى طولها عن ١ إلى ٢٪ من طول الكروموسوم وخالية من المعلمات، فإن هذه المناطق تعترض وتفصل التتابع للنيوكليوتيدات الناتج عن التداخل وهكذا تسبب تجزيئ فى رسم الخريطة أى تصبح بها gaps. وجد أن الخرائط الناتجة عن التحول البكتيرى لجينين مرتبطين أو أكثر cotransformational mapping لكروموسوم البكتريا ب. ستلس ينتج عنه حوالى خمسة مجاميع إرتباط مميزة. التجربة الكلاسيكية الفيزيائية وضحت المعلومات الناقصة وأعطت الدليل لترتيب هذه المجاميع.

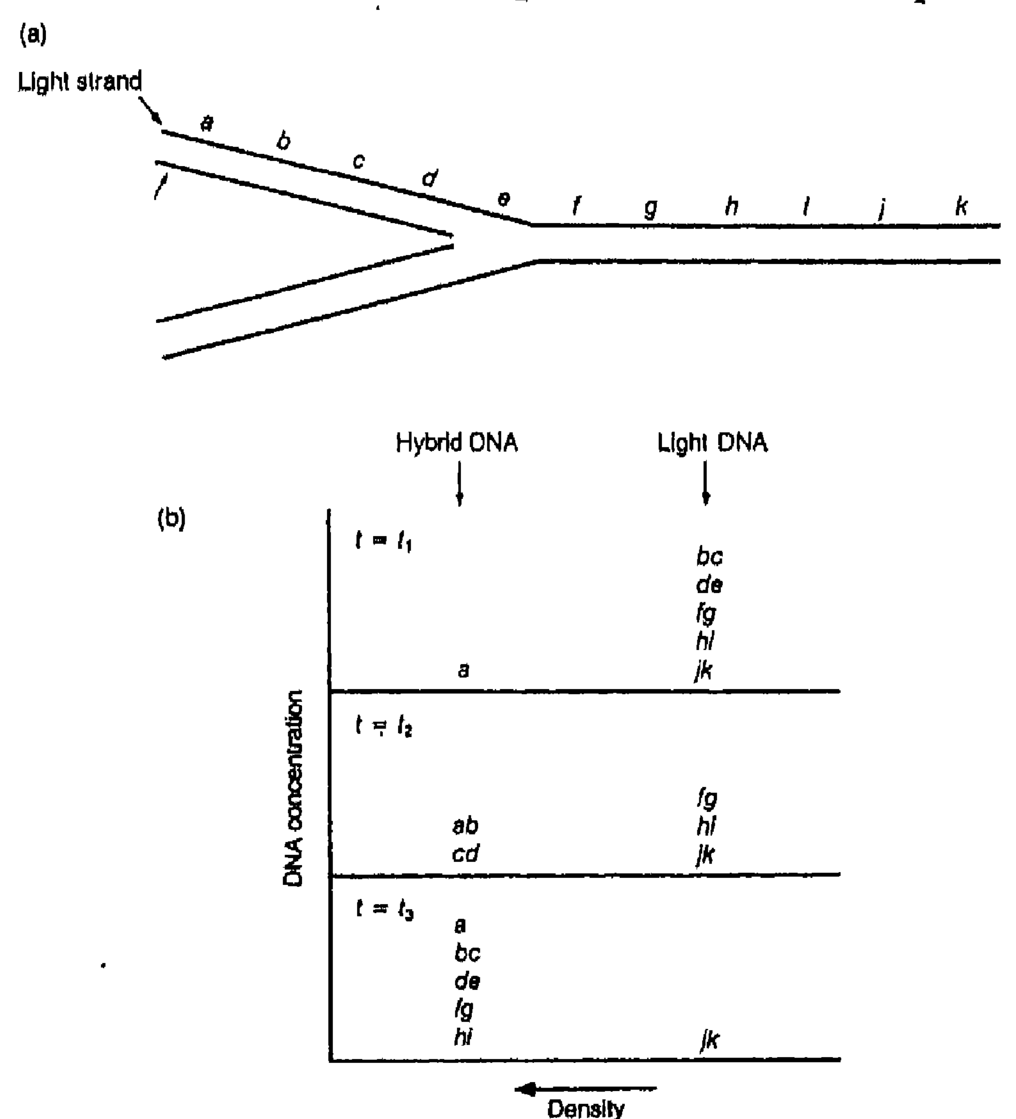
بإعتبار جزيئ دنا حلقى والذى يبدأ تكراره عند موقع معين مميز وحيث يكون التكرار أى التضاعف فى إتجاه واحد unidirectionally. يتم تكرار أى تضاعف المعلمات الوراثية تبعا للنظام أو الترتيب A ثم B ثم C وهكذا حتى Z أى من منطقة بداية التكرار إلى منطقة نهاية التكرار. بعد حدوث نشوء بداية التكرار سيوجد ضعف العدد من المعلمات A فى دنا عنه فى المعلمات Z. عند تقدم التكرار أى التضاعف، فإن عدد النسخ لكل معلم سيتضاعف وبالتتابع وبإنتظام تبعا للترتيب الموجودة به أثناء التكرار أى التضاعف أى التكاثر. وهكذا فى حالة مزرعة والتى يكون فيها جميع جزيئات دنا فى نفس المرحلة من التكرار أى التضاعف أى التكاثر، فإن أزمنة التتابع successive times أى الأزمنة المتتابعة التى فيها يتضاعف عدد كل معلم (بعد كل زمن معين بالتتابع يتضاعف عدد أكبر من الجينات أو المعلمات) وهكذا يكون ذلك دليل على الترتيب التتابعى لتضاعف أى تكاثر كل معلم. لو أن دنا عزل من مزرعة البكتريا فى أزمنة مختلفة وأستخدم كواهب لدنا فى تجربة تحول بكتيرى، فإن قياس بسيط لتكرارية أى عدد مرات حدوث التحول البكتيرى يعطى دليل على تتابع الجينات أى ترتيبها (تكرارية حدوث أى عدد مرات حدوث التحول البكتيرى يرتبط بتركيز دنا). ولكن لكثير من الأسباب قياس تكرارية حدوث التحول البكتيرى بهذه الطريقة وبحيث تكون النتيجة على درجة كافية من الدقة، تعتبر هذه الطريقة غير ملائمة لذلك أى غير مفضلة. وفيما يلى بعض التغييرات فى هذه التجربة. تعتبر البكتريا ب.

ستلس مكونة للجراثيم. وتعتبر الجراثيم فورمة من البكتريا ساكنة خاملة غير نشطة، وهذه الجراثيم تتكون عندما تتعرض أنواع البكتريا لضغوط أى إجهاد stress شديدة مثل التجويع لعدم توفر المغذيات فى بيئة البكتريا. فى حالة تكوين الجراثيم فإنه يحدث تضاعف أى تكرار للكرموسوم البكتيرى. لا تنقسم الجراثيم وتظل خاملة ساكنة لسنوات. عند تعريض الجرثومة لبيئة مناسبة مثل درجة حرارة عالية وبيئة فيها وفرة فى المواد الغذائية فإنها تنبت وتتحول إلى خلية بكتريا عادية تنمو وتنقسم. بداية إنقسام أى تضاعف أى تكرار دنا يحدث متزامن مع إنقسام الخلية وتقريبا فى نفس الوقت. عند إنبات الجراثيم فى بيئة تحتوى على D_2O أى ماء ثقيل (أى ٢ ديوتيريم وذرة أوكسجين فتكون ماء ثقيل حيث أن الإيدروجين موجود فة صورة ديويتريم) ولذلك فإن دنا البنوى أى حلزون دنا البنوى الناتج يجتوى على ديوتيريم (D) بدلا من الإيدروجين وهكذا سيكون لهذا الحلزون كثافة أعلى عن الحلزون الطبيعى أو الحلزون الأبوى. وهكذا إنقسام أى تكرار أى تضاعف لدنا من النوع الشبه محافظ semiconservative replication ويمكن تتبع ذلك بعزل دنا على فترات مختلفة وترسيب دنا فى حالة إتزان فى محلول كلوريد السيزيوم (سبق شرح هذه الطريقة سابقا) وسيتم شرحها بطريقة أخرى فى هذا الباب فى جزء تالى بعنوان هو إستخدام البلازميدات فى الهندسة الوراثية. وحيث أن كل منطقة من دنا الكروموسوم تتضاعف فإن الشظايا الناتجة من هذه المنطقة المتضاعفة تتحول فى كثافتها من كثافة طبيعية منخفضة إلى كثافة خاصة بالشظية الهجين أى شظية تحتوى حلزون عادى به إيدروجين وحلزون ثقيل به ديوتيريم. وبناء على ذلك فقد تم عمل التجربة التالية. حيث يتم تنمية الجراثيم فى بيئة ثقيلة أى محتوية على ماء ثقيل كما سبق شرحه. وفى أزمنة مختلفة فإنه يتم عزل دنا ويتم عمل طرد مركزى فى كلوريد السيزيوم. فى كل زمن معين يتم عزل شظايا أو أجزاء خفيفة غير متضاعفة وشظايا أو أجزاء ثقيلة متضاعفة وبعد ذلك تختبر هذه الشظايا بعد كل زمن معين بواسطة التحول البكتيرى للإستدلال على وجود عدد كبر من المعلمات فى كل منها (شكل

٥٦). تضاعف أى تكرار المعلم يتم التعرف عليه من وجود المعلم فى دنا خفيف إلى وجوده فى دنا هجين switching. وفى هذه الحالة يكون المعلم قد تضاعف أى قد تكرر. زمن وجود المعلم فى دنا خفيف فى بداية التجربة إلى زمن وجوده فى دنا هجين يسمى زمن التغير أو التحول switching time. يعتبر زمن التحول دالة على موعد أى وقت أى زمن تضاعف المعلم أى تكراره أى تكاثره وهكذا بحساب زمن التغير أو التحول لكل جين أو معلم فإن تعاقب هذه الأزمنة يدل على أماكن وجود الجينات والمعلمات على هذا الكروموسوم وموقع كل جين ومعلم بالنسبة للآخر وهكذا يمكن عما خريطة فيزيائية لذلك physical map. وهكذا. هذه الخريطة الفيزيائية يمكن ضمها إلى خرائط إرتباط عديدة أخرى والتى تم عملها من تجارب إرتباط جينين أو أكثر بواسطة التحول البكتيرى catransformation والتى فيها يتم عمل مجاميع إرتباط مختلفة، وهكذا يمكن ضم هذه الخرائط جميعها فى خريطة واحدة شاملة تكون معبرة إلى حد كبير.

لسوء الحظ يوجد تعقيدات رئيسية عند عمل التحليلات السابقة لعمل الخرائط المطلوبة ومنها أن البكتريا ب. ستلس مشابهة للبكتريا إ. كولاى، حيث تكرار أى تضاعف دنا يحدث فى إتجاهين. وهكذا نقل معلمين من منطقة دنا الخفيف إلى منطقة دنا الهجين فى أزمنة متقاربة لا تعنى أنها متقاربة على الكروموسوم الواحد، حيث يمكن أن تتكرر أى تتضاعف بشوكتى التكرار replication واللتين تتحركان فى إتجاهين عكسيين ويعنى ذلك أن المعلمين متباعدين عن بعض تماما والمسافة بينهما كبيرة. وهكذا فغن المعلم A والذى يتكرر أى يتضاعف بعد ١/٤ جيل يمكن أن يكون موقعه فى خريطة دائرية (حلقية) ١٠٠ وحدة عند المكان أى الموقع ٢٥ أو ٧٥ وأن المعلم B والذى يتكرر بعده بمدة قصيرة (وليكن ثلاث وحدات متأخرا أى بعد المعلم A بثلاث وحدات) يمكن أن يكون عند المكان ٢٨ أو ٧٢. لو أن واحدة من شظايا الإرتباط linkage segments تحتوى A، B فإنها كلاهما يكونا عند الموقعين ٢٥، ٢٨ أو عند الموقعين ٧٢، ٧٥ لأنهما مرتبطين. ويمكن حل ذلك بفحص عدد كبير

من المعلمات وبذلك الأجزاء المحيرة فى رسم الخريطة يمكن حلها وبالفعل تم الحصول على خريطة وراثية ممتازة للبكتريا ب. ساتلس بهذه الطريقة. هذه الخريطة تم تزويدها بترتيب جينات تم التعرف عليه بواسطة طرق transduction العامة (generalized transduction procedures).



شكل ١٩٠: كيفية إكتشاف حدوث التحول البكتيرى لجينات أو معلمات بواسطة الماء الثقيل وتحديد مواقع الجينات أو المعلمات.

(a) أ – تضاعف دنا فى إتجاه واحد يوضح جينات من a إلى k وقد حدث ذلك فى جزء من زمن دورة حياة البكتريا فى بيئة ماء ثقيل D2O.

(b) ب– نتيجة الطرد المركزى مع التدرج فى الكثافة فى وجود كلوريد السيزيوم. الأحرف تدل على الجينات المتنقلة فى الأزمنة المختلفة فى تتابع معين وذلك بواسطة التحول البكتيرى.

أستعمالات أخرى للتحول البكتيرى
Other uses Of Transformation

يمكن إستعمال التحول لأغراض أخرى خلاف عمل الخرائط. أحد الإستعمالات هو لتحديد أن بعض الكيماويات تعمل مباشرة على دنا. عند تعريض بكتريا أو حيوان إلى مركب كيماوى خاص ويحدث التطفر فإن الفرد يمكن أن يكون متأكد نتيجة لتكوين الطفرات أن المركب الكيماوى يعمل مباشرة على دنا. بالتبادل أى متبدلا مع ذلك أى خلافا لما سبق، يمكن أن يكون ناتج تحلل المركب الكيماوى مركب نشط وليست هو ذاته، أو أن المركب الكيماوى يمكن أن ينتج ممر تطفرى mutagentic pathway من نوع معين. لو أن دنا نقى تم تعريضه للمركب الكيماوى، على أى حال، ثم يستعمل فى تجربة تحول، إنتاج الطفرات سيكون دليل مباشر على أن المركب الكيماوى ذو تأثير على دنا. هذه التجربة يمكن عملها عاديا فى تجربة التحول catransformation. بإعتبار أن جينين مرتبطين بشدة، مثال ذلك، Str و *lac*. لو أن دنا من سلالة واهبة لها التركيب الوراثى $lac^- Str^r$ قد أستعمل لتحويل الخلية المستقبلة $lac^+ Str^s$ وأن Str^r قد أختير كمعلم فإن بعض الخلايا Str^r ستكون أيضا -lac. لو أن السلالة الواهبة كانت lac^+، على أى حال، فإن المعلم lac^- لا يظهر فى الخلية المستقبلة. وهكذا، لو أن دنا من الواهب lac^+Str^r تم معاملته بواسطة مطفر معروف وأن المطفر يعمل مباشرة على دنا، بعض خلايا lac^- ستوجد بين المتحولات Str^r. هكذا، وجود المتحولات $lac\ Str^r$ سيشير أن المطفر نشيط مباشرة على دنا أى يعمل مباشرة على دنا.

التحول يكون مفيد أيضا فى تعريف دنا أى فى التعرف وتحديد دنا. مثال ذلك، فى تجربة فيها يتم عزل دنا من خلية مصابة بفاج يتم فصل دنا إلى مجاميع بواسطة الترسيب الموقعى zonal sedimentation أو الهجرة فى مجال كهربائى، من الضرورى عادة أن يتم فصل دنا البكتريا عن دنا الفاج والتعرف عليها فى مجاميع

مختلفة. فى حالة ب. ستلس، إختيار كل جزء من دنا البكتريا ودنا الفاج بواسطة التحول للمعلمات البكتيرية يمكن أن يستعمل لتحديد نوعيه دنا البكتريا.

التحول فى الطبيعة

Transformation In Nature

يتم عمل التحول فى المعمل بواسطة دنا نقى. السؤال، على أى حال، هل يمكن حدوث التحول فى الطبيعة. يحدث التطور جزئيا بالطفرات وجزئيا بإعادة الصياغة، يبدو أن التحول يحدث وينشأ فى كائنات ينقصها آليات أخرى لتبادل دنا. والضرورى لحدوث التحول فى الطبيعة هو تحرير دنا من الخلايا ونشوء التنافس competence. كثير من البكتريا الموجبة لصبغة جرام مثل ب. ستلس يحدث لها تحلل وبتحرر منها دنا عند كبر الخلايا فى السن أو عند تعريضها للجوع أو لبيئات مختلفة ضارة. وهكذا، يوجد مدد متوفر من دنا فى البيئة. أكثر معلومية وهى الحقيقة أن التحول قد لوحظ عندما كانت المزارع المعلمه وراثيا من البكتريا ب. ستلس تم خلطها أى أن التحول يلاحظ أكثر عند خلط المزارع. وإفتراضيا، أن بعض دنا قد تم تحرره من المزارع وأن جزء صغير من الخلايا يكون دائما متنافس، مؤديا إلى حدوث تحول. علاوة على ذلك، أمكن ملاحظة التحول فى بكتريا معلمة مختلفة تم وضعها فى القناة الهضمية للفأر. التحول فى الطبيعة غير كثير الحدوث أى قليل الحدوث. بإعطاء الزمن أى توفر الزمن الخاص بالتغيرات التطورية، على اى حال، يمكن أن يكون التحول قوة هامة فى تطور الميكروبات عبر الأحقاب الجيولوجيه.

أستخدام البلازميدات فى الهندسة الوراثية ونقل الصفات الوراثية بواسطة التحول البكتيرى

تتميز البلازميدات بأنها تحتوى على جينات مقاومة للمضادات الحيوية ولذلك تجعل الخلايا البكتيرية الحاملة لها مقاومة لتأثير المضادات الحيوية القاتل على

الخلايا البكتيرية. وهذه الخلايا المقاومة تستعمل بكثرة كأداة جيدة فى الهندسة الوراثية. عندما يحتاج مهندس الوراثة نقل صفة معينة من الإنسان إلى سلالة بكتيرية لا يوجد بها هذه الصفة فإنه يستعمل خلايا بكتيرية بها بلازميد به جين أو أكثر مقاوم لمضاد حيوى معين مثل البنسلين. حيث يقوم بلصق جزء من DNA المحتوى على الجين المطلوب الخاص بالإنسان فى البلازميد المقاوم للبنسلين. ثم يستخلص DNA البلازميد من الخلايا البكتيرية ويضاف إلى مزرعة خلايا بكتيرية حساسة للبنسلين. يمكن أن ينتقل DNA البلازميد إلى بعض الخلايا البكتيرية الحساسة للبنسلين والنامية على البيئة وتسمى هذه الخطوة بالتحول الوراثى transformation. عند دخول DNA إلى الخلايا البكتيرية يتكاثر بها ويحدث له تكاثر أيضا فى أثناء تكاثر الخلية البكتيرية. ثم تأخذ البكتريا الموجودة على البيئة وتخطط على بيئة آجار مغذى أو أى بيئة مشابهة وأن تحتوى هذه البيئة على البنسلين أيضا. ثم توضع الأطباق فى الحضان لمدة يومين فى درجة حرارة مناسبة. تموت الغالبية العظمى من الخلايا البكتيرية لأنها حساسة للبنسلين. ولكن النادر فى هذه الخلايا والمحتوى على البلازميد ينمو على البيئة لأنه مقاوم للبنسلين. ولذلك فإن المستعمرات البكتيرية النامية على البيئة فى أطباق بترى تحتوى على أجزاء من DNA البلازميد والذى قد يحمل الصفة المطلوبة. ولذلك نستخدم صفة المقاومة للمضاد الحيوى لتسهيل فحص عدد قليل نسبيا من الخلايا البكتيرية بدلا من فحص ملايين الخلايا البكتيرية والتى تحتوى على أى جزء من DNA البلازميد المطلوب نقله وبالتالى لا تحتوى على الصفة المطلوب نقلها. أما الخلايا المقاومة للبنسلين فقد تحتوى على الصفة المطلوب نقلها. حيث أنه ليس من الضرورى أن تكون جميع الخلايا المقاومة للبنسلين تحتوى على هذا الجين ولكن عادة بعض منها. أى أنه مما سبق يتضح أنه توجد أربعة حالات للبكتريا *E. coil* كما يأتى:

١ – خلايا بكتيرية لا تحتوى على أى بلازميد.

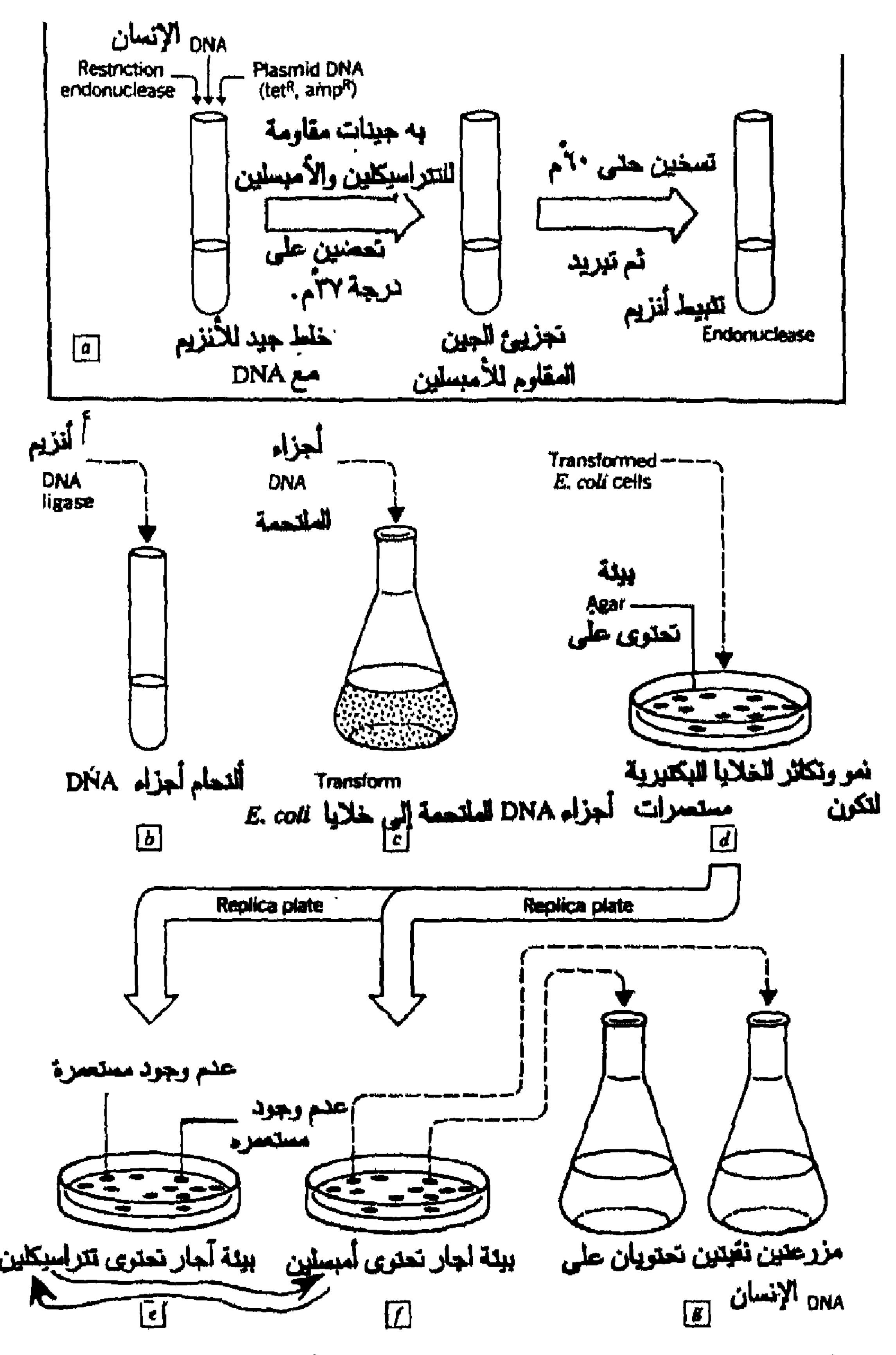
٢ - خلايا بكتيرية تحتوى على DNA بلازميد وهذا الأخير لا يحتوى على DNA من الإنسان.

٣ - خلايا بكتيرية تحتوى على DNA بلازميد وهذا الأخير يحتوى على جزء من DNA الإنسان ولكنه لا يحتوى على الجين المطلوب.

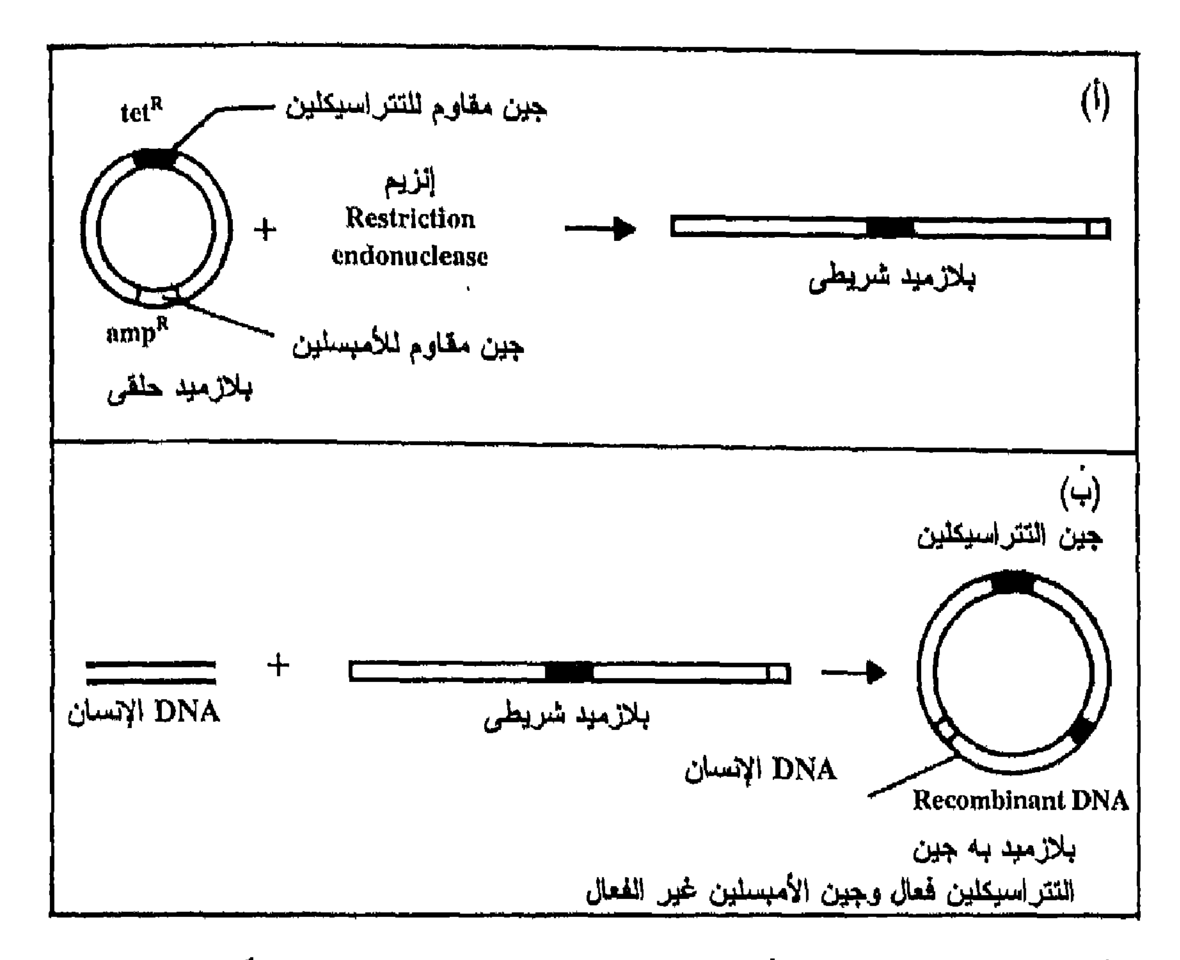
٤ - خلايا بكتيرية تحتوى على DNA بلازميد وهذا الأخير يحتوى DNA الإنسان كما يحتوى الجين المطلوب.

تعتبر المجموعة الرابعة من الخلايا البكتيرية هى المطلوبة. تعتبر هذه الخلايا نادرة وقد تكون بنسبة خلية واحدة فى البليون خلية. إستعمال خلايا بلازميد به صفات المقاومة للمضاد الحيوى مثل البنسلين أو تتراسيكلين أو ستربتوميسين وكما سبق ذكره سيستبعد المجموعة الأولى من الخلايا ويتبقى لدينا الثلاث مجاميع الأخرى من الخلايا (شكل ٥٧).

ولذلك فإنه يجب إستعمال بلازميد به جينين وليس جين واحد خاصين بمقاومة المضادات الحيوية وليكن أحدهما خاص بمضاد حيوى من مجموعة البنسيللينات وهو أمبسيللين ampicillin (amp^R) والآخر خاص بمقاومة التتراسيكلين tetracyclin (tet^R). يستعمل إنزيم القطع restriction endonuclease متخصص فى قطع البلازميد فى منتصف جين المقاومة للأمبسيللين ولذلك يصبح البلازميد شريطى وليست حلقى. توجد أنواع عديدة من إنزيمات القطع فيختار الأنزيم الذى يمكنه قطع البلازميد فى منتصف جين مقاومة أمبسيللين. عند إضافة جزء من DNA الإنسان إلى البلازميد فإنه يلتصق بأحد طرفى البلازميد الشريطى. ثم التسخين لدرجة حرارة ٦٠ ْم لتثبيط الأنزيم ثم يضاف إنزيم DNA ligase بواسطته يتم إلتحام أجزاء DNA ولصق طرفى البلازميد مرة أخرى ليصبح مستدير. يصبح جين المقاومة للأمبسيلين غير فعال حيث أنه ينفصل إلى جزئين نتيجة لوجود جزء من DNA الإنسان (شكل ٥٨). يصبح البلازميد فعال فقط فى مقاومة التتراسيكلين. يتم أدخال أجزاء DNA الملتحمة والبلازميد داخل خلايا بكتيرية لنوع البكتريا *E. coil* وذلك عن طريق عملية التحول البكتيرى Transformation.



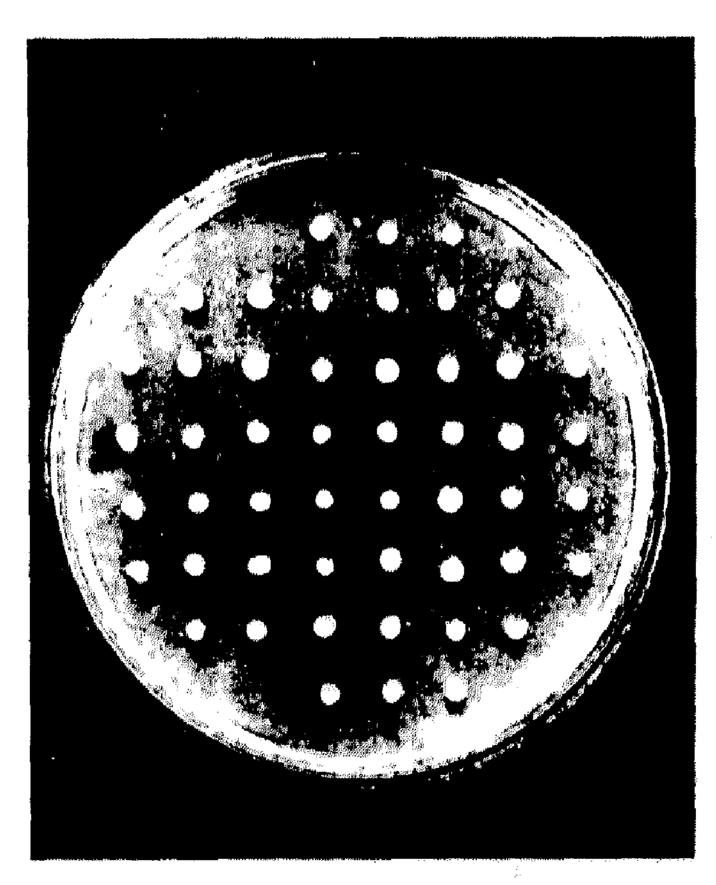
(شكل ٥٧): طريقة للحصول على مزارع نقية من البكتريا تحتوى على DNA الإنسان
cloned human DNA.



(شكل ٥٨): تثبيط الجين: (أ) بلازميد حلقى به جين مقاوم للتراسيكلين وجين مقاومة للأمبسيللين. وفى وجود إنزيم. R. E. يصبح البلازميد شريطى. (ب) جـزء مـن DNA الإنسان إلتحم بالبلازميد فى منتصف منطقة الجين المقاومة للأمبسلين وسبب ذلك فصل منطقة الجين إلى جزئين وبذلك يصبح الجين مثبط وغير فعال فى أظهار الصفة.

حيث توضع البلازميدات فى بيئة سائلة تحتوى على البكتريا *E. coli*. وفى هذه الحالة فإن البكتريا التى تحتوى على بلازميد غير محتوى على أى جزء من DNA الإنسان تكون مقاومة لكل من أمبسيللين والتتراسيكلين. تفحص جميع المستعمرات البكتيرية النامية على بيئة بها تتراسيكلين لإختبار المستعمرات الحساسة للأمبسيللين أى المستعمرات الغير قادرة على النمو والتكاثر على بيئة بها أمبسيللين. ثم توضع قطعة من الحرير أو القطيفة معقمة لتلامس سطح المستعمرات البكتيرية النامية على بيئة الآجار (شكل ٥٩) المحتوية على التتراسيكلين. بعض الخلايا البكتيرية من كل مستعمرة سوف تلتصق إلى قطعة القطيفة. تزال قطعة القطيفة ثم توضع فى طبق بترى

به بيئة آجار مغذى nutrient agar مخلوط بالأمبسيللين توضع قطعة الحرير بحيث أنها تلامس سطح البيئة وبالطبع يكون هذا الطبق نظيف خال من أى مستعمرات بكتيرية. تلتصق الخلايا البكتيرية من كل مستعمرة بكتيرية بسطح البيئة. تنمو فقط الخلايا إلى مستعمرات على البيئة فى حالة مقاومتها للأمبسيللين. يسمى هذا افختبار بإسم صورة طبق الأصل لتنمية المستعمرات البكتيرية على البيئة replica plating. سيتم توزيع الخلايا وبالتالى المستعمرات فى الأطباق بنفس التوزيع السابق فى الطبق الأول الأصل.



شكل ٥٩ : طبق بترى يحتوى على بيئة آجار عليها مستعمرات بكتيرية مرتبة فى صفوف grid patteren.

سيتم مقاومة توزيع المستعمرات البكتيرية فى الطبق الثانى بالطبق الأول وفى حالة مكان المستعمرات الخالية فى الطبق الثانى تعتبر هى المستعمرات المطلوبة وهى الحساسة للأمبسيللين. وفى الشكل يتضح أنه توجد مستعمرتين فقط حساسة للأمبسيللين. يتم نقل لقاح من كل مستعمرة على حدة بواسطة إبرة التلقيح البكتيرية

إلى دوارق مخروطية تحتوى على بيئة المرق المغذى nutrient broth. تنمو هذه الخلايا فى البيئة وتنتج أعداد هائلة من الخلايا البكتيرية التى تحتوى على جزء من DNA الإنسان. وبهذا الإختبار يتم تضييق الخناق وتستبعد الخلايا البكتيرية الموجودة فى رقم ٢ وتصبح لدينا خلايا بكتيرية تشمل المجموعة رقم ٣ والمجموعة رقم ٤. ولكن حتى هذه الخطوة لا يمكن التكهن بتركيب DNA الإنسان الداخل فى تركيب البلازميد وهل يحتوى هذا الجزء من DNA على الجين المطلوب أو يحتوى أجزاء أخرى لاتحتوى الجين المطلوب. والحقيقة أن فرصة الحصول على بلازميد به الجين المطلوب تكون نادرة. ولذلك يجب تكرار طريقة replica plating لمرات كثيرة للحصول على عدد من الخلايا البكتيرية يحتمل أن يوجد به الجين المطلوب. وإختبار replica plating سهل ويمكن إستعمال خلايا بكتيرية مقاومة لأنواع كثيرة من العقاقير والمضادات الحيوية ويمكن الكشف عنها بمقاومة شكل توزيع المستعمرات على البيئة فى الطبق الأول والطبق الثانى ويمكن بذلك الحصول على آلاف من المستعمرات البمتيرية المطلوبة. وعندما يتم الحصول على عدة آلاف من المستعمرات البكتيرية المطلوبة نبدأ فى عمل الخطوات التالية وذلك للحصول على الخلايا البكتيرية المحتوية على جين الإنسان المطلوب.

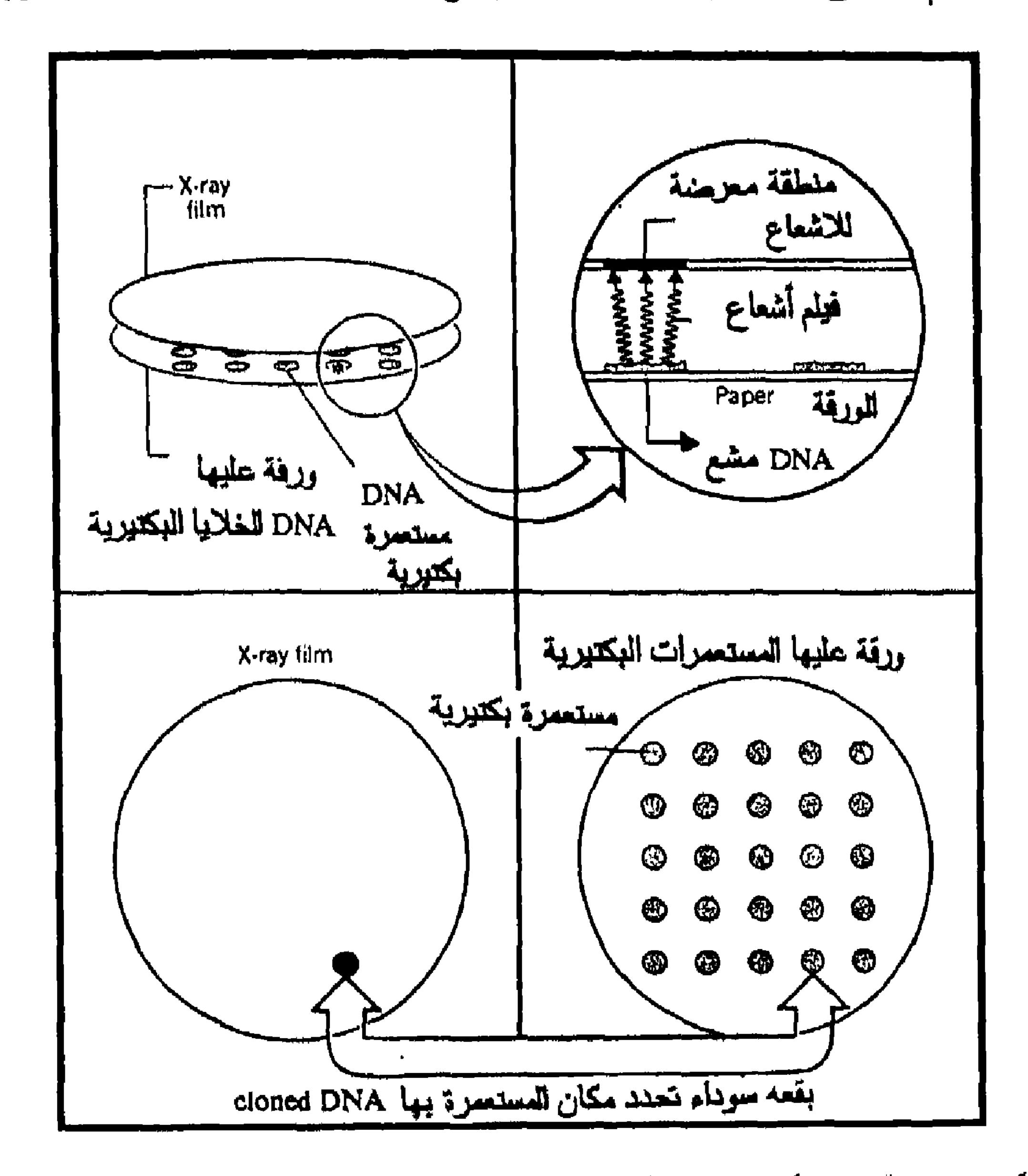
يؤخذ من كل مزرعة بكتيرية ،مستعمرة) عينة وذلك بواسطة إبرة التلقيح وتوضع على سطح بيئة آجار مغذى أو أى بيئة آجار مناسبة فى طبق بترى. يتم تخطيط قاع طبق بترى بقلم شمع إلى مربعات يكون عددها عادة خمسون او يتم عمل خمسون مربع على ورقة ووضع هذه الورقة تحت طبق بترى. توضع عينة واحدة بكتيرية فى منتصف كل مربع وبذلك يحتوى طبق بترى الواحد على خمسون عينة تنمو لتكوين خمسون مستعمرة. وبعد تمام نمو الخلايا البكتيرية وتكوين المستعمرات توضع ورقة معقمة على سطح المستعمرات سيلتصق جزء من المستعمرات بسطح الورقة ويصبح توزيع المستعمرات على الورقة يماثل تماما توزيعها فى الطبق.

توضع الورقة فى محلول صودا كاوية مخفف. تسبب الصودا الكاوية تكسير خلايا البكتريا ويتبقى ملتصق بالورقة بشدة بعض أجزاء من بقايا الخلايا وأيضا DNA. تسبب الصودا الكاوية أيضا فصل حلزونى DNA ويصبح خيطين منفصلين. ولذلك فإن DNA يوجد فى بقع على الورقة. يمكن أن تكون الورقة المستعملة مقسمة إلى مربعات لها نفس عدد ومساحة مربعات الورقة. وبذلك يمكن لمهندس الوراثة أن يحدد DNA الموجود على الورقة والمستعمرة الخاصة به الموجودة فى الطبق. ثم تعادل الصودا الكاوية على الورقة بواسطة حامض ثم توضع الورقة فى طبق بترى به مجس معلم أى مشع radioactive probe. يعتبر المجس عبارة DNA مكمل للجين المطلوب وقد تم تخليقه وتركيبه من RNA رسول خاص بالجين المطلوب. يعتبر المجس خيط فردى من DNA وأيضا DNA الموجود على الورقة خيط فردى كذلك. ولذلك فى هذه الحالة سيلتصق بشدة المجس مع DNA الورقة المتوافق معه أى الخاص بالجين المطلوب.

ولن يلتصق المجس مع أى DNA غير متكامل معه. ولذلك فإن DNA الجين المطلوب على الورقة سيصبح مشع. وبإختبار الأماكن المشعة على الورقة تكون هى الخاصة بالجين المطلوب. ولتقدير أماكن الأشعاع على الورقة تزال الورقة من الطبق المحتوى على المجس المشع وتغسل بشدة بالماء لإزالة أى بقايا للمجس المشع الغير ملتصقة بـــ DNA وبالطبع المجس المشع الملتصق بالــــ DNA للجين المطلوب لايغسل بالماء ويظل ملتصق بالورقة تعرض الورقة لفيلم أشعة x وفى الأماكن التى يوجد بها أشعاع أى يوجد بها DNA الجين المطلوب تظهر على هيئة بقعة سوداء. ولذلك فإن البقع السوداء تحدد مكان الجين المطلوب (شكل ٦٠).

ومكان وجود هذه البقع على الورقة يحدد مكان DNA المطلوب وعن طريق DNA يحدد مكان المستعمرة فى الطبق والتى تحتوى على خلايا بكتيرية تحتوى بلازميد حامل لجين الإنسان المطلوب. ومن هذه المستعمرة يمكن الحصول على

أعداد لانهائية من الخلايا البكتيرية الحاملة لجين الإنسان. وقد يكون هذا الجين هو الجين اللازم لتخليق الأنسولين وبذلك يمكن إنتاج الأنسولين بواسطة خلايا البكتريا.



شكل ٦٠: تحديد مكان والتعرف على المستعمرة البكتيرية التى تحتوى خلاياها علـى DNA جين الإنسان.

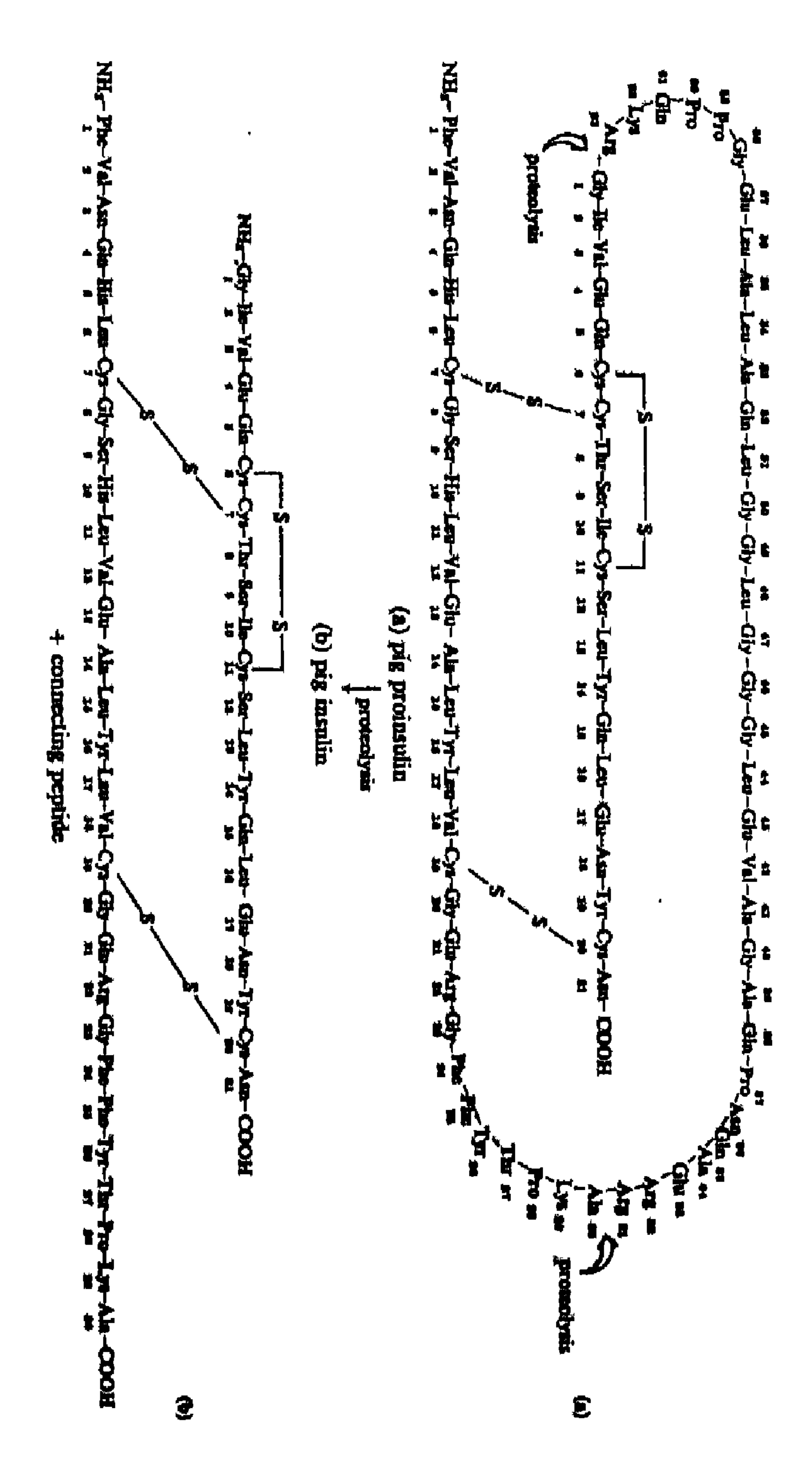
تخليق الأنسولين بواسطة البكتريا :

يعتبر الإنسولين نوع من البروتين الوظيفى أى بروتين له دور معين فى الخلية. يوجد فى الإنسان العادى جين خاص بإنتاج الإنسولين ولكن مرضى السكر ينقصهم تكوين الإنسولين بتركيزات عالية نسبيا ولذلك يحتاج مريض السكر إلى إنسولين

إضافى ويؤخذ هذا الإنسولين عن طريق الحقن، يؤثر الأنسولين على إحتراق السكر فى الجسم. يحتاج الجسم إلى كميات من الإنسولين لإتمام عملية أحتراق أى تحليل السكر. ومريض السكر يكون غير قادر على إتمام هذه العملية على الوجه الأكمل ولذلك بالرغم من وجود السكر فى جسمه إلا أنه يطلب المزيد من السكر وذلك لنقص إحتراق أى تحليل السكر فى الجسم نتيجة لنقص الأنسولين ولذلك يتم حقنه بالإنسولين. ينتج الإنسولين. ينتج الإنسولين. ينتج الإنسولين قبل إكتشاف طرق الهندسة الوراثية عن طريق إستخلاصه من بنكرياس الخنازير (شكل ٦١) أو ما يشابهها وكانت عملية إنتاجه مكلفة. ولكن الإنسان عن طريق الهندسة الوراثية أمكنه نقل جين إنتاج الأنسولين من الإنسان إلى البكتريا. طريقة عمل ذلك هى الطريقة المذكورة فى الجزء السابق مباشرة. يتضح أن هذه الطريقة أسهل وأرخص فى إنتاج الإنسولين وذلك بالمقارنة من إنتاج الإنسولين من بنكرياس الحيوان. فى بعض الحالات يمكن أن يسبب إنسولين بنكرياس الحيوان حساسية للإنسان وبذلك تصبح الأمور أكثر تعقيدا ولكن لحسن الحظ فإن الإنسولين المنتج بواسطة البكتريا لايسبب هذه الحالة من الحساسية.

كيفية فصل DNA البلازميد والجين المنقول:

فى التجربة السابقة وبعد الحصول على بلايين من الخلايا البكترية التى تحتوى جين الإنسان والنامية على بيئة سائلة broth فإنه يمكن فصل DNA البلازميد عن DNA الجين المنقول من الإنسان والحصول على كل منهما منفردا وذلك فى خطوات عديدة كما يلى:

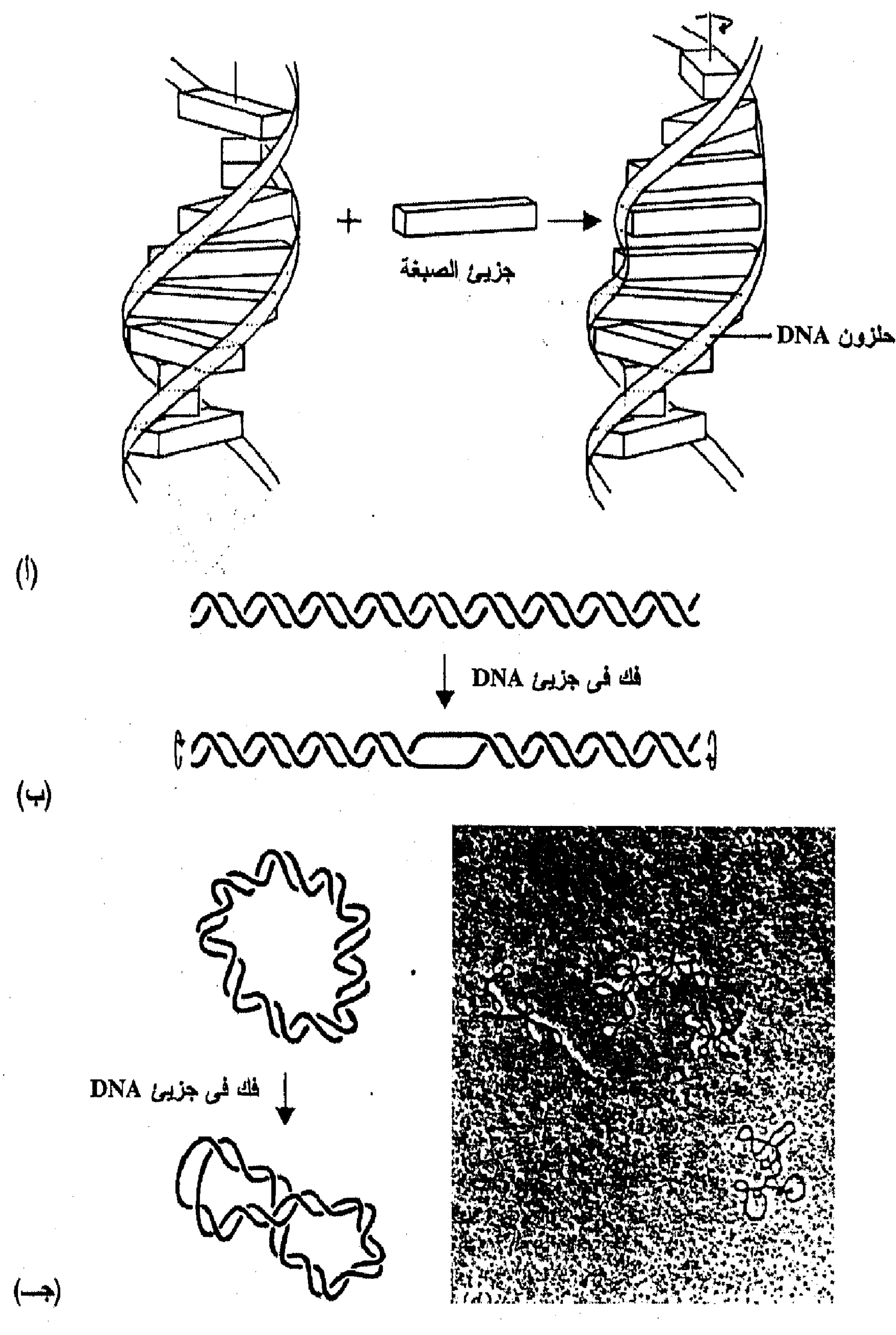


شكل ٦١: تنشيط بروإنسولين (بدائى الإنسولين) الخنزير (a) وتحويله إلى أنسولين (b) بواسطة تحليل للبروتين (لاحظ موقع التحليل عند السهمين proteolysis). لاحظ أن الببتيدات اللاحمه connecting peptide تستخدم فى الكشف عن سرعة تخليق الإنسولين حتى فى الإنسان وتكون أدق من تقدير تركيز الإنسولين. لأن الإنسولين يستخدم بإستمرار بواسطة الجسم ولذلك لايعطى فكرة دقيقة عن سرعة تخليقه أما سرعة إختفاء هذه الببتيدات اللاحمه من الجسم أبطأ بكثير من الإنسولين.

يضاف للمعلق أنزيمات ومركبات تشبه الصابون detergent تسبب تحليل جدر الخلايا البكتيرية ويتحرر DNA الخلايا البكتيرية و DNA البلازميدات من الخلايا ويسمى ذلك الخليط الموجود فى الأنبوبة باسم ناتج تحلل الخلايا cell lysate، يتم فصل DNA الخلية البكتيرية عن DNA البلازميد وحيث الأول أطول بدرجة كبيرة جدا عن الثانى فقد يكون طوله ألف مرة أو أكثر. ولذلك فإن أحدى الطرق هى تعريض DNA لقوة طاردة مركزية فسيرسب DNA البكتيرى فى القاع ويبقى البلازميد فى أعلى. ولكن فى كثير من الحالات لا تصلح هذه الطريقة لأن كمية DNA البكتيرى تكون كبيرة جدا بالمقارنة بالبلازميدات ولذلك لا يكون الفصل كامل بينهما.

وفى الطريقة الثانية يتم تكسير DNA الخلية البكتيرية بسهولة نتيجة لطوله. وذلك عن طريق إمتصاص محلول منه بواسطة ماصة لمرات عديدة. يسبب ذلك تكسير DNA الخلية البكتيرية إلى أجزاء خيطية الشكل ولا تسبب هذه المعاملة تكسير البلازميد ويبقى مستدير كما هو. يمكن فصل أجزاء DNA الخلية عن البلازميد بسهولة نتيجة لإختلافهما فى الكثافة النسبية relative density والقدرة على الطفو buoyancy. قدرة الإنسان على الطفو أو العوم يمكن التحكم فيها بطريقتين فعند إسترخاء الإنسان مع عدم الحركة يمكن أن يطفو على سطح الماء وعند ربط حله النجاه life jachet بالإنسان فإنها تسبب تقليل الكثافة النسبية وبذلك تساعد الإنسان على الطفو إلى أعلى وسهولة الطفو وأيضا العوم والعكس صحيح فإذا ربط الإنسان بقطع صخرية كبيرة الحجم فإنها تزيد من الكثافة النسبية وتسبب جذبه إلى أسفل وصعوبة الطفو والعوم وإذا كانت زائدة الحجم فإنها تسبب غرقة. ولذلك فإن الكثافة النسبية لها تأثير واضح على درجة الطفو. وبالإضافة إلى ذلك فإن الكثافة النسبية للماء تؤثر على الطفو أيضا فكلما زاد تركيز الملح فى الماء كلما زادت الكثافة النسبية وكلما زادت سهولة الطفو والعوم للإنسان. ولذلك فإن الطفو والعوم فى البحر الميت ذو التركيز العالى من الملح يكون أسهل بدرجة كبيرة من العوم فى البحار العادية لإرتفاع تركيز الملح فى الأول بالنسبة لتركيزه فى البحار العادية، وهذه

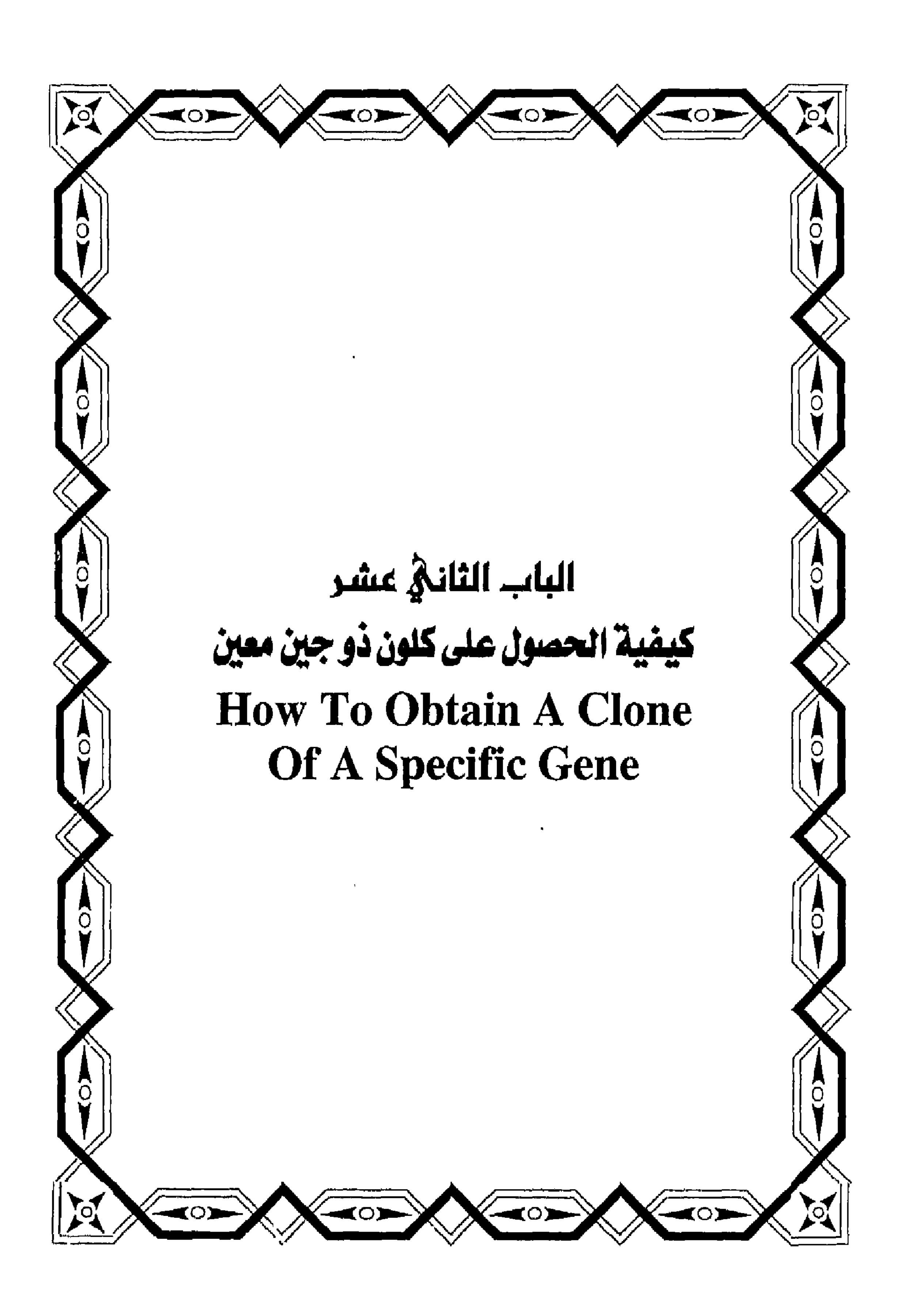
القاعدة الخاصة بطفو الإنسان هى ذاتها الخاصة بطفو الجزيئات وغيرها فى أنابيب الأختبار فى المعمل ويعتبر ذلك مثال لتوضيح كيف أن الجزيئات تطفو فى المحاليل. يمكن ملىء أنابيب الأختبار بمحلول ملحى ولذلك فإن تركيز الملح يزيد فى الإتجاه من أعلى إلى أسفل ويسمى التغيير التدريجى فى التركيز concentration gradient وينتج عن ذلك تغير تدريجى فى الكثافة density gradient. نتيجة لذلك يمكن أن نتحكم فى تركيز الملح فى أنبوبة الإختبار بحيث يكون DNA معلق فى محلول الملح حيث أنه عند وضع جزيئ DNA فإنه يسقط إلى أسفل فى المحلول ويتوقف عن السقوط ويصبح معلق عندما تتساوى كثافة DNA مع كثافة محلول الملح. درجة سقوط DNA فى المحلول يتحدد بكثافة جزيئ DNA وكثافة المحلول. يمكن التحكم فى طفو DNA البكتيرى حيث يضاف له حله الحياة life jacket وهى عبارة عن جزيئات صبغه ethidium أو مايشابهها فتقلل من كثافة الجزيئ وتساعده على الحركة إلى أعلى المحلول. يحث ذلك بشراهة لجزيئ DNA الخيطى ولايحدث لـــ DNA البلازميد أى الحلقى والسبب فى ذلك أنه عند دخول جزيئ الصبغة بين حلزونى DNA الشريطى فإن الحلزونى ينفك ويأخذ جزيئات صبغة أكثر ويزداد الفك وذلك لأن طرفى DNA الشريطى سائبين وتحدث هذه العملية بسهولة فى DNA الشريطى أما DNA المستدير فأطرافه ملتحمة ولاتوجد أطراف حرة ولذلك لاينفك الحلزون بسهولة ويكون إتحاده بجريئات الصبغة محدود (شكل ٦٢). ولذلك يمكن فصل DNA الشريطى للكرموسوم عن DNA الحلقى للبلازميد بعد معاملتهما بالصبغة وتركهما فى أنبوبة إختبار بها محلول ملحى مركز نسبيا ونتيجة للجاذبية الأرضية سيحدث الفصل بينهما ولكن يحتاج ذلك إلى وقت طويل.



شكل ٦٢: تداخل الصبغة فى داخل حلزونين DNA. (أ) دخول الصبغة بين الحلزونين، (ب) فك حلزونى DNA الشريطى، نتيجة لدخول الصبغة، (جـ) فك حلزونين DNA الحلقى نتيجة لدخول الصبغة.

ولذلك يمكن إختصار الوقت بخلط نوعى DNA مع الصبغة مع المحلول الملحى وتعريضهم لقوة طرد مركزى فى جهاز الطرد المركزى والذى يلف بسرعة كبيرة نسبيا ونتيجة لذلك يحدث الفصل بسرعة تزيد عن مائة ألف مرة قدرة الجاذبية الأرضية. قد يحتاج الأمر إلى عمل الطرد المركزى لمدة يوم أو أكثر. وفى هذه التجارب تكون الصبغة عادة بروميد الأثيديم **ethidium bromide** والمحلول الملحى يكون من الأملاح الثقيلة مثل كلوريد السيزيوم **cesium chloride** وتخلط فى أنبوبة بلاستيك وتعرض لقوة طرد مركزية سرعتها خمسة وثلاثون ألف فى الدقيقة (r p m) لمدة يومين. وقبل تشغيل الجهاز يوضع فى الأنبوبة زيت معدنى ليملأ فراغ الأنبوبة ويمنع إنبعاجها أثناء سرعة عملية الطرد المركزى. يتم فحص الأنبوبة بعد عملية الطرد المركزى بواسطة الأشعة الفوق بنفسيجية أو جزء قريب من فوق الأشعة البنفسيجية يسمى الضوء الأسود **black light**. نتيجة لوجود الصبغة فى جزيئات DNA فإنها تمتص الأشعة فوق البنفسيجية ويحدث للضوء عملية فلوره ويحدث تكون أى إشعاع ضوء برتقالى لامع فى أجزاء الأنبوبة المحتوية على DNA. يدل هذا الأشعاع البرتقالى على مكان DNA فى الأنبوبة ونتيجة لذلك يوجد حزمتين ضوئيتين الحزمة الضوئية العليا تدل على مكان DNA الكروموسوم والحزمة الضوئية السفلية تدل على مكان وجود DNA البلازميد. يمكن سحب DNA البلازميد من الأنبوبة بواسطة ماصة مناسبة وبذلك يوجد لدينا DNA بلازميد نقى. يمكن بعد ذلك فصل جين أو جينات الإنسان من البلازميد ويكون أولا بقطع DNA البلازميد إلى أجزاء بواسطة إنزيمات القطع (r. e.). ينتج عن ذلك تكون أجزاء خيطية (شريطية) صغيرة من البلازميد (راجع عمل إنزيمات القطع). يمكن فصل هذه الأجزاء عن بعضها بواسطة الفصل نتيجة الهجرة فى وسط غروى فى مجال كهربائى **gel electrophoresis**. ولابد من التعرف على مكان عمل إنزيمات القطع المستعملة أى أماكن القطع المختلفة على البلازميد ويحتاج ذلك إلى عمل ما يسمى بالخرائط

mapping أى عمل خرائط لجزيئ DNA البلازميد لتحديد أماكن القطع بواسطة أنزيمات القطع (r. e.).



الباب الثاني عشر

كيفية الحصول على كلون ذو جين معين

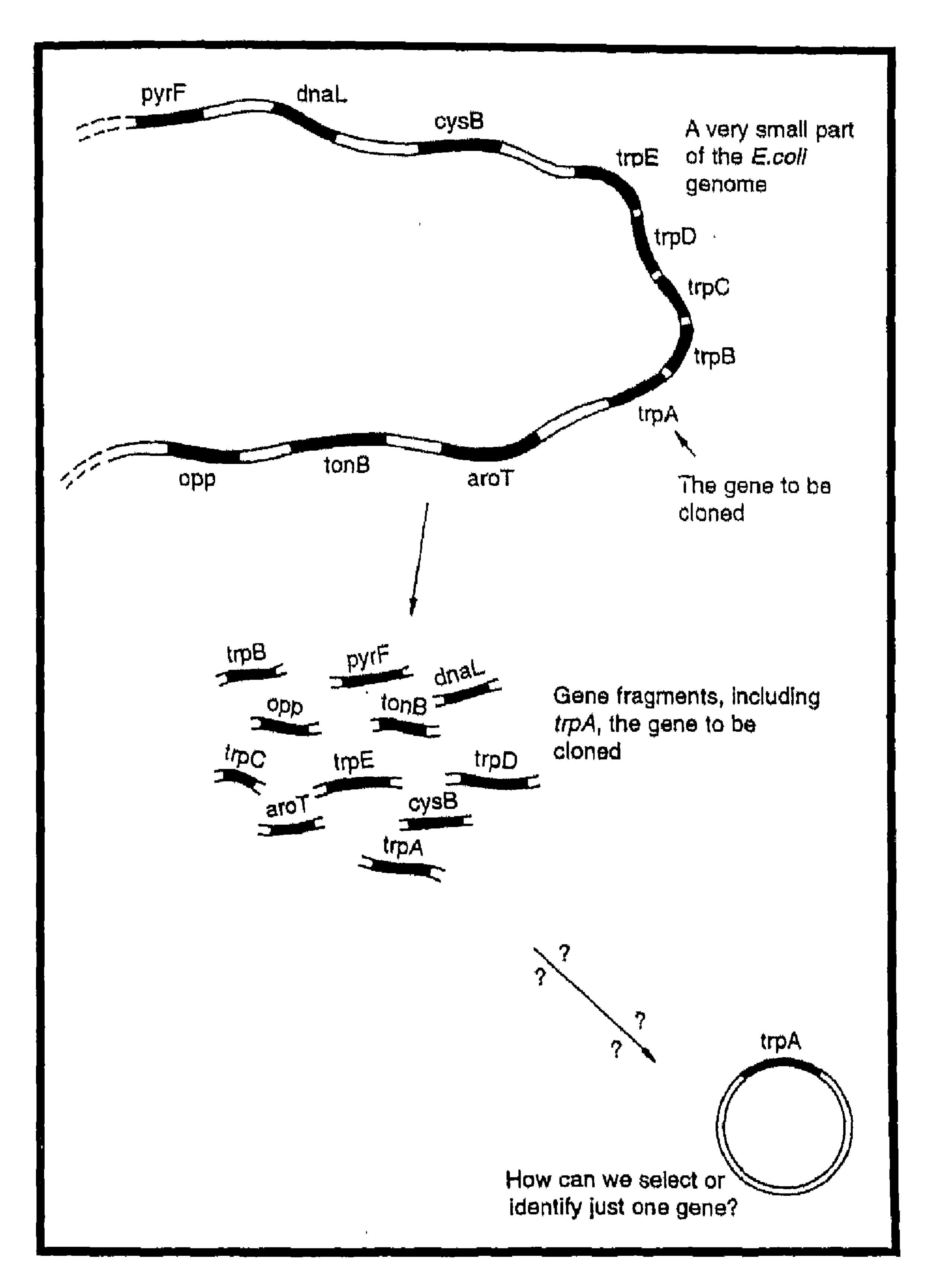
How To Obtain A Clone Of A Specific Gene

الباب الثاني عشر
كيفية الحصول على كلون ذو جين معين
How to Obtain A Clone of A Specific Gene

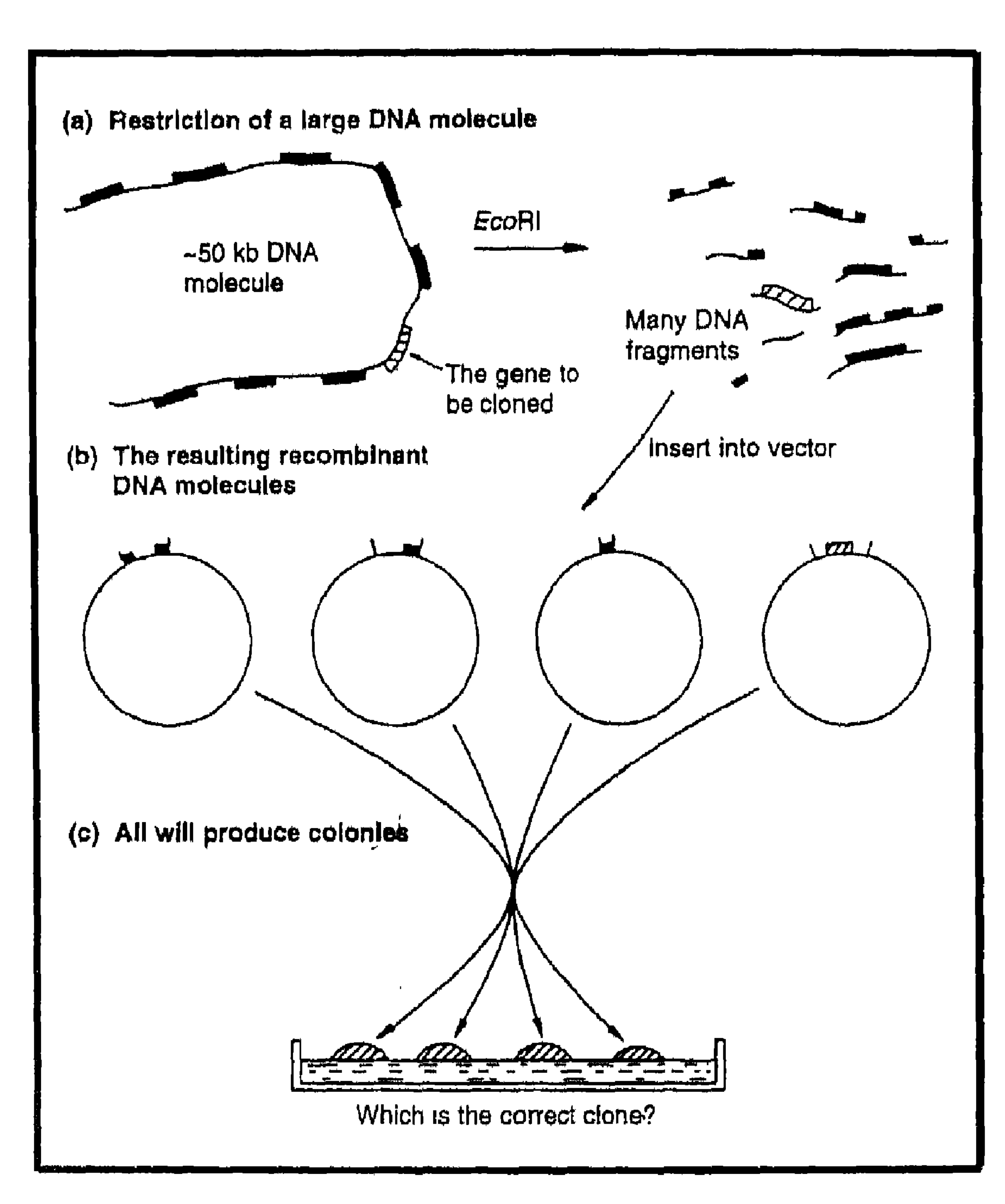
عند عمل القطع ثم الإلتحام بين الناقل الوسيط (ويسمى vector وأحيانا يسمى cloning vehicle) والجين المطلوب فإنه يمكن أن توجد حالات وسطية أخرى كثيرة وهى إلتحام أجزاء غير مرغوبة من دنا الكائن الأصلى مع الناقل الوسيط ولذلك تكون هذه الحالات الوسطية غير مرغوبة ويكون المرغوب حالة واحدة فقط هى حالة الناقل الوسيط الحامل للجين تحت الدراسة والمطلوب توطينه ولشرح ذلك فى حالة البكتريا إ. كولاى فإن الطاقم الوراثى genome لهذه البكتريا يحتوى حوالى ٤٠٠٠ جين مختلف فإذا أخذنا جزء صغير جدا من الكرموسوم البكتيرى والمطلوب هو توطين جين معين trp A من هذا الجزء. وقد قمنا بعمل قطع لهذا الجزء الصغير وفصلناه إلى جينات منفصلة منفردة (شكل ٦٣) وستكون كثيرة نسبيا. فإن الناقل الوسيط سيلتحم بجميع هذه الجينات كل على حدة وسيكون من العسير التعرف على الناقل الوسيط الحامل للجين المطلوب. ولذلك لابد من وجود طرق فعالة لأختيار الناقل الوسيط المعاد صياغته والمطلوب أى المحتوى على الجين المطلوب. حيث أنه من الشرح السابق (شكل ٦٤) يتضح أنه توجد أيضا ناقلات وسيطة معاد صياغتها ولكنها تراكيب غير مرغوبة. ويمكن تعيين الناقل الوسيط المعاد صياغته المطلوب بإحدى طريقتين:

١ – الأنتخاب المباشر direct selection للجين المطلوب (شكل ٦٥).

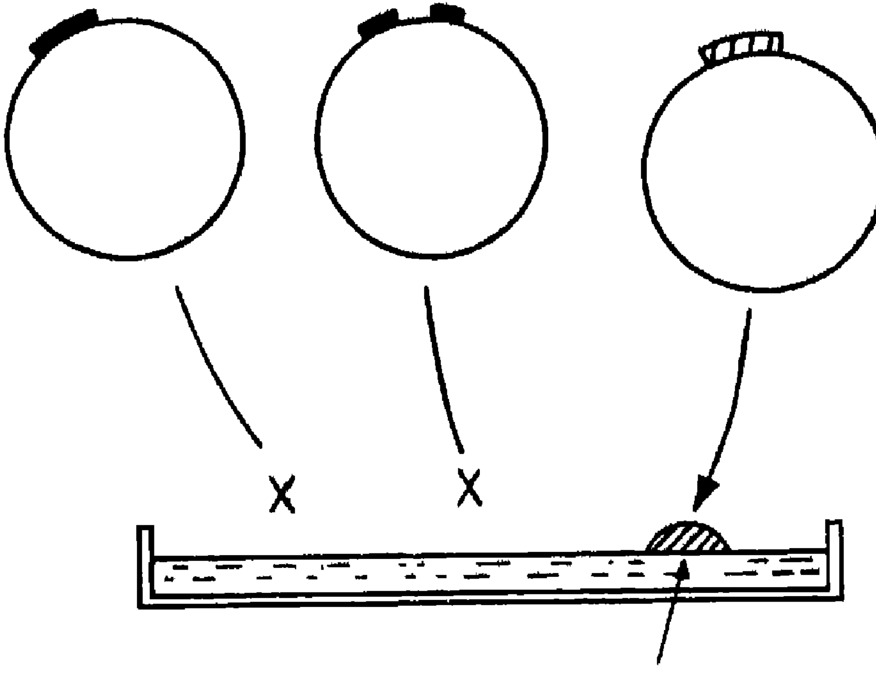
٢ – التعرف على الكلون من مكتبة الجينات a gene library. وفيها يتم عمل مكتبة كلونات clone library تحتوى جميع أو أغلب الجينات الموجودة فى الخلية. ثم يتم عمل تحليل للكلونات كل كلون على حدة للتعرف على الكلون الصحيح المطلوب (شكل ٦٥).

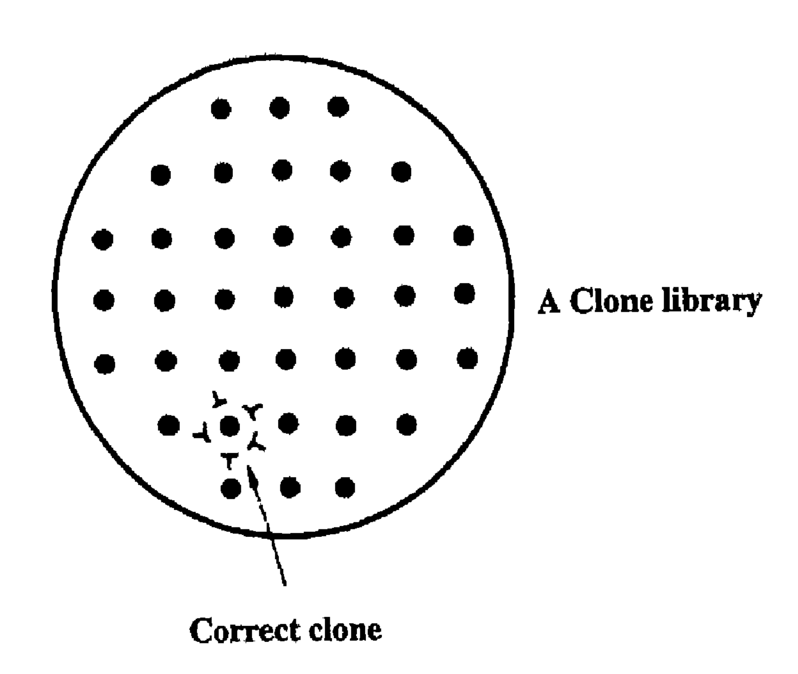


شكل ٦٣: صعوبة التعرف على الناقل الوسيط الحامل للجـين A **trp** والمطلـوب توطينه.



شكل ٦٤: صعوبة إنتخاب الجين المطلوب من الجينات العديدة.



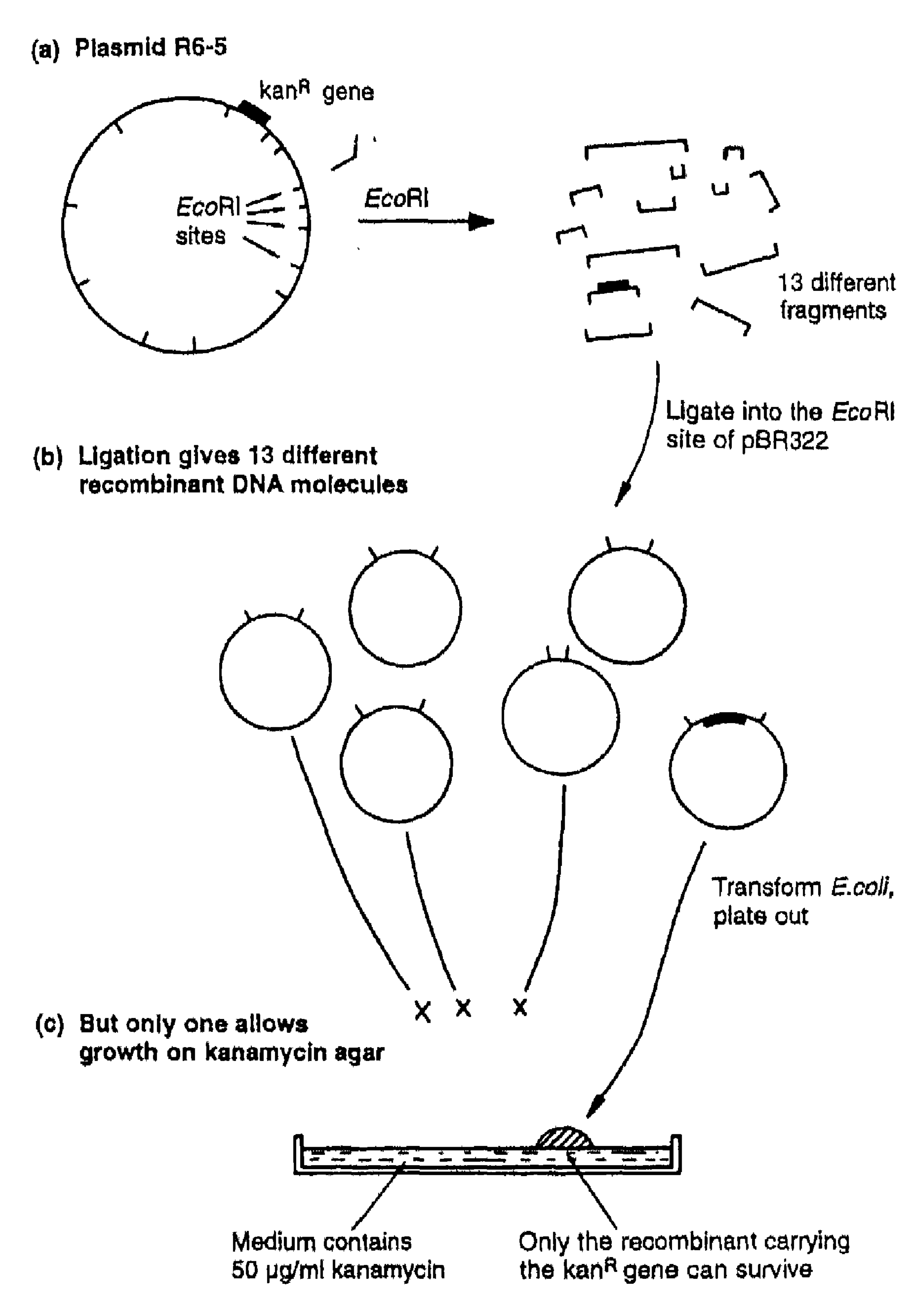


شكل ٦٥: كيفية الحصول على كلون معين بإحدى طريقتين: (a) الإنتخاب المباشـــر، (b) التعرف على الكلون المطلوب من مكتبة الكلونات.

تعتبر طريقة الإنتخاب المباشر الطريقة المفضلة لأنها سريعة وغير مبهمة ولكنها لا تصلح لجميع الجينات. عامة التعرف على الكلون هام جدا خاصة وأن مكاتب للكلونات كاملة ومعروفة لكثير من الكائنات.

الإنتخاب المباشر
Direct Selection

للحصول على الجين المطلوب لابد من زراعة الخلايا المحتوية على دنا المعاد صياغته المحتوى على الجين المطلوب توطينه على بيئات صناعية فى المعمل وحيث يتم إنتخاب هذه الخلايا وإختيارها من بين الخلايا الغير مطلوبة. ومن أسهل الأمثلة على ذلك هو عندما يكون الإنتخاب وجود جين مقاوم للمضادات الحيوية لكى يحدث الإنتخاب المباشر. ومثال ذلك أنه مطلوب توطين جين مقاوم للكاناميسين من البلازميد R6-5. يحمل هذا البلازميد عديد من الجينات خاصة بمقاومة أربعة مضادات حيوية وهى كاناميسين وكلورامفينكول وستربتوميسين وسلفون أميد sulphonamide. يقع جين المقاومة للكاناميسين فى داخل واحدة من الشظايا، وهذه الشظايا عددها ١٣ شظية فى حالة *Eco* RI (شكل ٦٦). ولتوطين هذا الجين لابد من إدخاله فى المكان *Eco* RI لناقل وسيط مناسب مثل pBR322. الخليط الملتحم مع الناقل الوسيط للبلازميد الأخير يحتوى ١٣ دنا معاد صياغتها مختلفة أى ١٣ حالة من الناقل الوسيط أحدهما يحمل جين المقاومة للكاناميسين. ثم زراعة هذا الخليط على بيئة تحتوى على كاناميسين فإن المستعمرات النامية على هذه البيئة هى فقط الناتجة من دنا معاد صياغته يحتوى على جين المقاومة للكاناميسين وهكذا يحدث الإنتخاب مباشرة عن طريق هذه البيئة الإنتخابية selective medium.



شكل ٦٦: إنتخاب مباشر للجين المطلوب توطينه وهو المقاومة للكاناميسين Kan^R،
.(Kan^R) gene

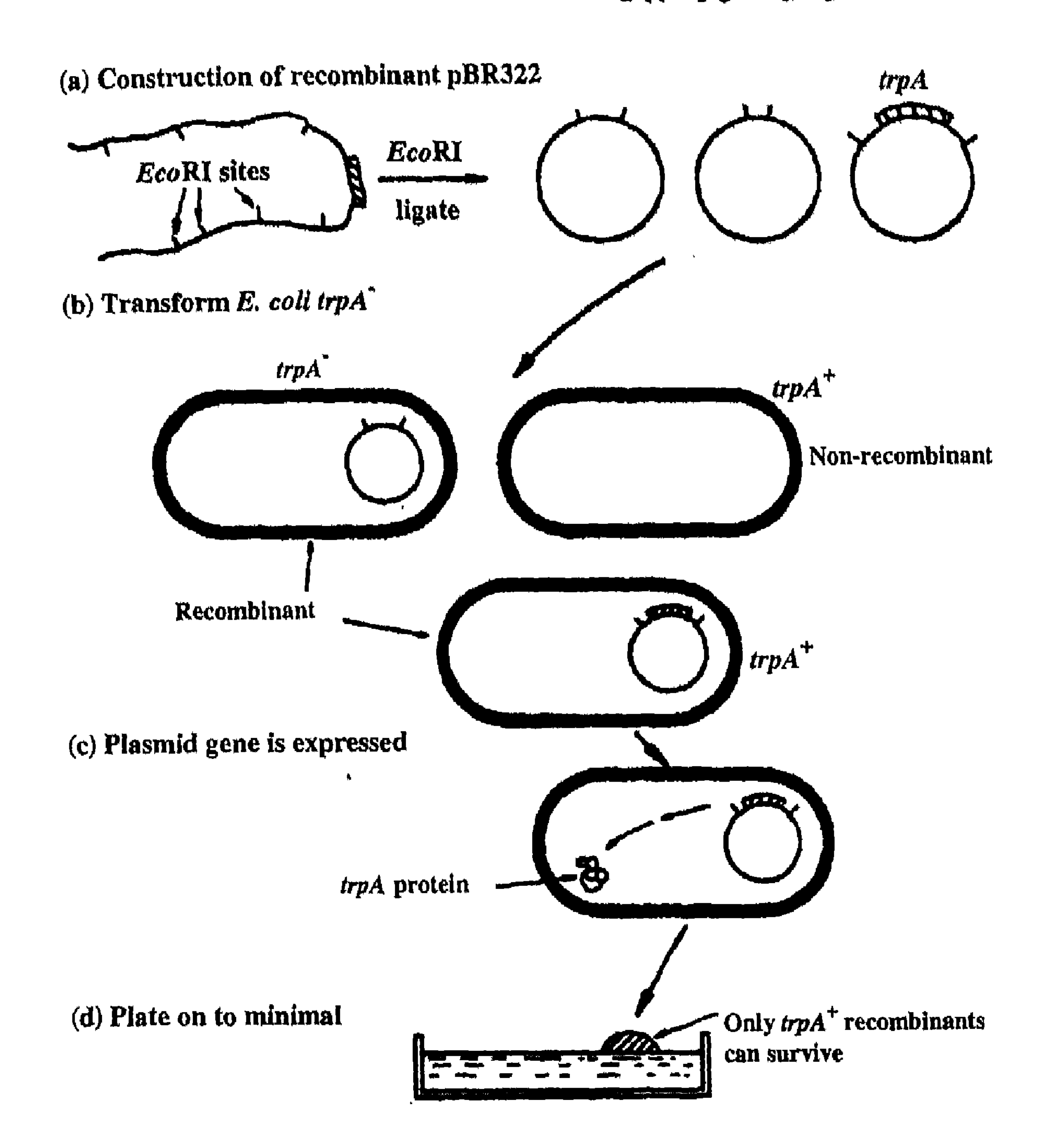
وجود المعلم يزيد مدى وكفاءة الإنتخاب المباشر:

Marker rescue extends the scope of direct selection

مما يزيد من فاعلية طريقة الإنتخاب المباشر أى يزيد من كفاءتها ومداها هو إستعمال الطفرات والتى يمكن إستعمالها كمعلم. فيمكن الإنتخاب للمقاومة للمضادات الحيوية ويمكن الإنتخاب أيضا عن طريق المعلمات markers الناتجة من الطفرات. ومثال ذلك إستخدام الطفرة كمعلم فى حالة سلالات البكتريا إ. كولاى والتى تكون غير قادرة على تخليق الحامض الأمينى تربتوفان أى بمعنى آخر هى سلالات عادية من هذه البكتريا ثم حدثت لها طفرة أفقدتها القدرة على تخليق التربتوفان ذاتيا trp A ولذلك فإن هذه السلالات لا يمكن أن تنمو على البيئة إلا فى حالة إضافة التربتوفان. يمكن أن تستخدم هذه الطفرات فى توطين جين تخليق التربتوفان الطبيعى أى الطراز البرى (شكل ٦٧) يحدث ذلك بواسطة إستخلاص دنا الخلايا البكتيرية الكلى ثم هضمه بواسطة r. e. ثم لحمه بالناقل الوسيط منتجا عديد من جزيئات دنا المعاد صياغتها. أحد هذه الناقلات الوسيطة المعاد صياغتها بالحظ تحمل نسخة صحيحة من الجين *trp* A. ثم يتم نقل الخليط من الخلايا الغير قادرة على تخليق التربتوفان ذاتيا auxotrophes والمختلطة بالخلايا المعاد صياغتها وبالحظ تحمل واحدة أو أكثر نسخة صحيحة من الجين *trp* A. يتم نقل هذا الخليط وزراعته على بيئة الحد الأدنى minimal medium خالية من التربتوفان فلا تنمو أى خلايا إلا المحتوية على الجين *trp* A وهكذا تحتوى هذه الخلايا على دنا المعاد صياغته والحامل للجين المطلوب. الطفرة *trp* A^- غير قادرة على تخليق إنزيم تربتوفان synthetase والذى يقوم بتخليق التربتوفان. أما الحالة العادية أى السلالات البرية العادية فإنها قادرة على تخليق هذا الإنزيم طبيعيا وبالتالى تخلق التربتوفان طبيعيا. ومن الحالات التى تحدد إستعمال هذه الطريقة هى ما يأتى:

١ - لابد من وجود سلالة طفرة ينقصها الجين المطلوب دراسته. فهل توجد سلالات متطفرة لجميع الجينات المطلوب دراستها؟ هذا عامل محدد لإستخدام هذه الطريقة.

٢ - لابد من وجود ومعرفة بيئة الحد الأدنى والتى يمكن أن يعيش عليها الطراز العادى أى الطراز البرى فقط.



شكل ٦٧: إنتخاب مباشر للجين *trp* A المطلوب توطينـــه (المـــوطن) فى البكتريـــا إ. كولاى المسماة *trp* A⁻ (*E. coil trp* A⁻)

علامة يمكن إستخدام هذه الطريقة للمعلمات الخاصة بالجينات التى تشفر للإنزيمات المستخدمة فى التخليق الحيوى biosynthetic enzymes وفى وجود بيئة الحد الأدنى.

عامة هذه الطريقة غير قاصرة على البكتريا يمكن تطبيقها على سلالات أخرى auxotrophes من كائنات أخرى مثل الخميرة والفطريات الخيطية. أبحاث Beadle، Tatum على فطر Neurospora وهو فطر خيطي تناولت هذه الطفرة فى إنزيم tryptophan synthetase وقد سبق وصف عمل هذا الإنزيم فى شكل سابق. علاوة على ذلك فإنه يمكن إستخدام البكتريا مثل إ. كولاى وذلك بنقل جينات أخرى من كائنات أخرى خلاف البكتريا إلى هذه البكتريا وتستخدم هذه الطريقة بكفاءة عالية فى ذلك.

من عيوب هذه الطريقة أن أحيانا لا يمكن الحصول على سلالة طفرة لجين معين أو أن هذه السلالة غير موجودة بالفعل. ومن العيوب أيضا أن كثير من الطفرات البكتيرية ليست auxotrophes ولذلك فإن السلالات البرية والسلالات الطفرة لا يمكن تمييزها عند زراعتها على بيئة الحد الأدنى أو أى بيئة أخرى. ومن العيوب الأخرى أنه أحيانا عندما تكون الحاجة لنقل الجين من الحيوان أو النبات أو الإنسان إلى البكتريا، لا يمكن لهذا الجين المنقول أن يعبر عن نفسه فى الخلايا البكتيرية حيث أن الإختلافات كبيرة بين هذه الكائنات والبكتريا ولذلك فإن الإنزيمات الخاصة بهذا الجين لا تعمل فى خلية البكتريا. ولذلك نلجأ إلى أستعمال طرق أخرى للتمييز بين هذه الحالات وذلك بالتعرف على الجين من مكاتب الجينات أو مكاتب الكلونات gene or clone liberaries.

التعرف على الكلون من مكتبة الجينات
Identification Of A Clone From A Gene Library

مكتبة الجينات gene library أى مكتب الجينوم genom library هى عبارة عن مجموعة من الكلونات clones كافية فى العدد لأن تحتوى على كل جين موجود بالكائن الحى الخاص بالمكتبة.

يمكن تعريف مكتبة الجينوم genomic library أى مكتبة الطاقم الوراثى بأنها مجموعة من الكلونات المعاد صياغتها recombinant clones (أى بمعنى آخر أنها كلونات نشأت وتكونت عن طريق أعادة الصياغة recombination) والتى تحتوى على

جميع الجينات (دنا) الموجودة فى الكائن الحى. ومثال ذلك مكتبة الجينوم للبكتريا إ. كولاى والتى تحتوى على جميع جينات هذه البكتريا، ولذلك فإن أى جين مرغوب يمكن سحبه من المكتبة ويتم دراسته أو أستعماله. مكاتب الجينومات أى مكاتب الأطقم الوراثية يمكن الإحتفاظ بها لعديد من السنين كما أنه يمكن أن تكاثر propagated أى يمكن أن تكرر وهكذا فإن نسخ منها يمكن أن ترسل لأى فريق بحثى أو باحث.

من أهم الأسئلة فى ذلك. ما هو عدد الكلونات المطلوبة لمكتبة الجينوم أى مكتبة الطاقم الوراثى. يمكن الإجابة على هذا السؤال بإستخدام المعادلة الآتية:

$$N = \frac{\ln (1-P)}{\ln (1-a/b)}$$

N= عدد الكلونات المطلوبة

P= الإحتمال (أى عند الإحتمال ٩٥٪ مثلا لأى جين موجود)

a= متوسط حجم شظية دنا التى تم إدخالها فى الناقل الوسيط

b= الحجم الكلى للجينوم أى للطاقم الوراثى.

يوضح الجدول (جدول ٥) عدد الكلونات اللازمة لكل مكتبة طاقم وراثى أى جينوم لعديد من الكائنات الحية الدقيقة وغير الدقيقة نباتية أو حيوانية، والتى تم بناؤها بإستخدام الناقل الوسيط مثل الفاج لامدا أو الكوزميد cosmid. ماهو الكوزميد cosmid؟ هو عبارة عن هجين بين جزيئ دنا فى الفاج وبلازميد البكتريا. ويعتمد هذا التصميم على الحقيقة أن الإنزيمات اللازمة لتعبئة جزيئ دنا الفاج لامدا فى الغطاء البروتينى الخاص به أنها أى هذه الإنزيمات تحتاج فقط المواقع cos أى cos sites لكى تؤدى وظيفتها. فى حالة التجارب المعملية in vitro يمكن أن تحدث التعبئة فى حدوث الطاقم الوراثى للفاج لامدا وأيضا لامدا وأيضا يمكن أن تحدث التعبئة فى حالة وجود أى جزيئ دنا يحمل المواقع cos (cos sites) والتى تفصل بواسطة ٣٧ – ٥٢ كيلو قاعدة kb من دنا. بمعنى مبسط الكوزميد عبارة عن بلازميد يحمل cos site.

جدول ٥: عدد الكلونات اللازمة لمكاتب الجينومات أى مكاتب الأطقم لعديـــد مـــن الكائنات.

النوع	حجم الجينوم (bp)	عدد الكلونات* شظايا ١٧ kb**	شظايا ٣٥ kb***
إ. كولاى *E. coli*	٤,٨ × ١٠[٦]	٨٥٠	٤١٠
خميرة الخباز *S. cerevisiae*	١,٤ × ١٠[٧]	٢٥٠٠	١٢٠٠
ذبابة الدروسونيلا *D. melanogaster*	١,٧ × ١٠[٨]	٣٠,٠٠٠	١٤,٥٠٠
الطماطم	٧ × ١٠[٨]	١٢٣,٥٠٠	٥٩,٠٠٠
الإنسان	٣ × ١٠[٩]	٥٢٩,٠٠٠	٢٥٧,٠٠٠
الضفدعة	٢,٣ × ١٠[١٠]	٤,٠٥٣,٠٠٠	١,٩٦٩,٠٠٠

*قدرت على أساس الإحتمال ٩٥٪ لأى جين موجود فى المكتبة.

** شظايا قابلة لإعادة الصياغة بواسطة الناقل الوسيط مثل الفاج مثل λEMBL4.

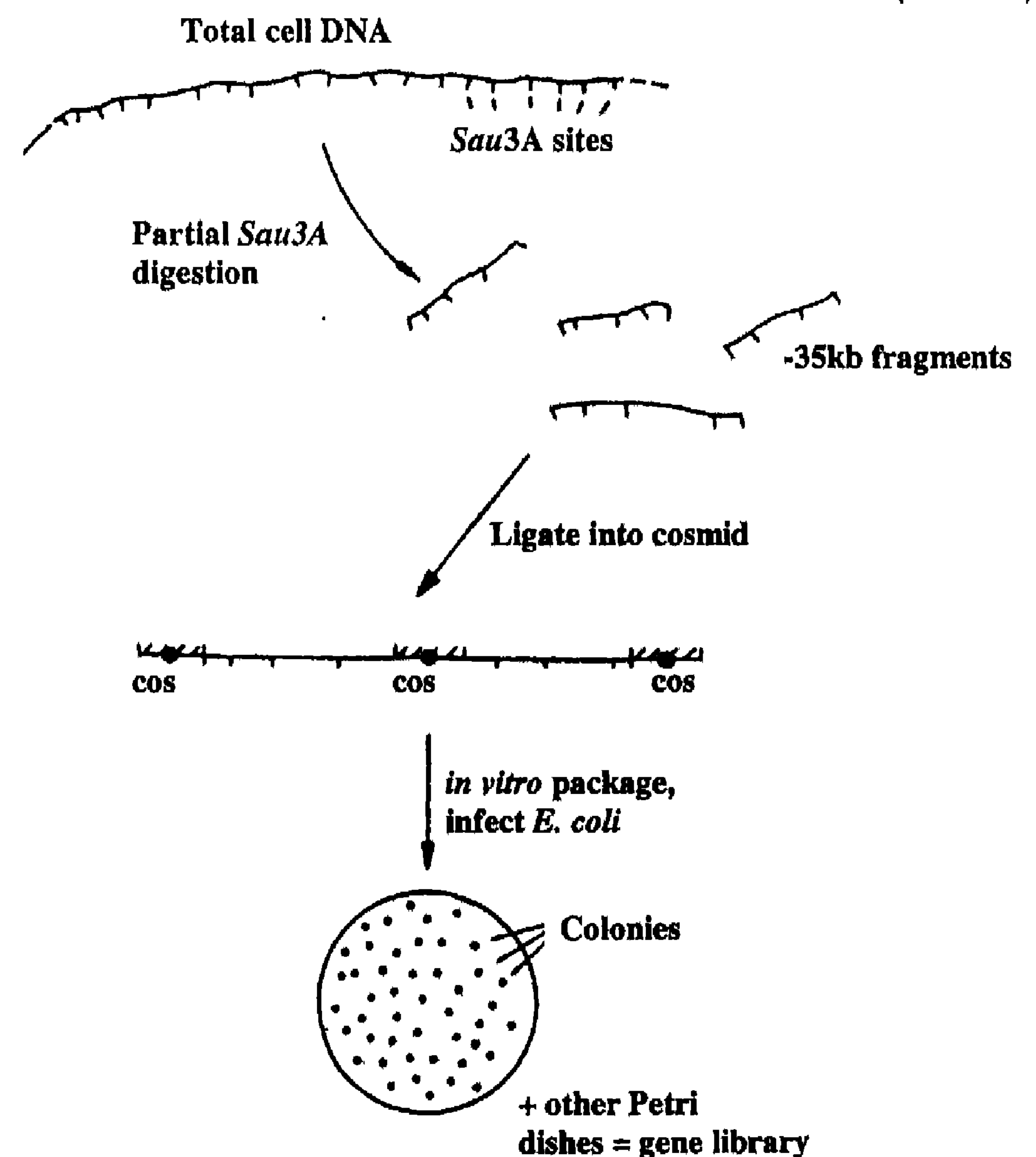
*** شظايا قابلة لإعادة الصياغة بواسطة كوزميد.

ولذلك من غير المعقول أن نحتفظ بواسطة مئات الألوف من الكلونات بالرغم من أن طرق التعرف على الجينات فى هذه الحالات ممكنة. ولذلك دائما يكون التفكير فى تقليل هذا العدد من الكلونات. أحد هذه الحلول لتقليل العدد هو إيجاد ناقلات وسيطة قادرة على التعامل مع جزيئات دنا كبيرة وإحتوائها. ولذلك فى السنوات الأخيرة فإن التركيز يكون على الفاج P1 والذى يتفوق على الفاج لامدا فى أنه قادر على أخذ ١١٠ كيلو قاعدة فى داخل الغطاء البروتين. وهكذا فإن الناقلات الوسيطة كثيرة ومنها طراز الكوزميد cosmid- type vectors ومنها بالذات المتكون من P1 فإنه مصمم لتوطين شظايا من دنا تتراوح فى أحجامها من ٧٥ – ١٠٠ كيلو قاعدة. هذا الناقل الوسيط يقلل عدد الكلونات اللازمة لمكتبة الطاقم الوراثى للإنسان من ٢٧٥,٠٠٠ كلون فى حالة الكوزميد لامدا إلى ٩٠,٠٠٠ كلون فى حالة الكوزميد P1.

علاوة على ما سبق فإنه تم عمل ناقلات وسيطة حديثة novel vectors ومنها ناقل وسيط حديث أساسه البلازميد F ويسمى بالكروموسومات التركيبيه البكتيرية bacterial

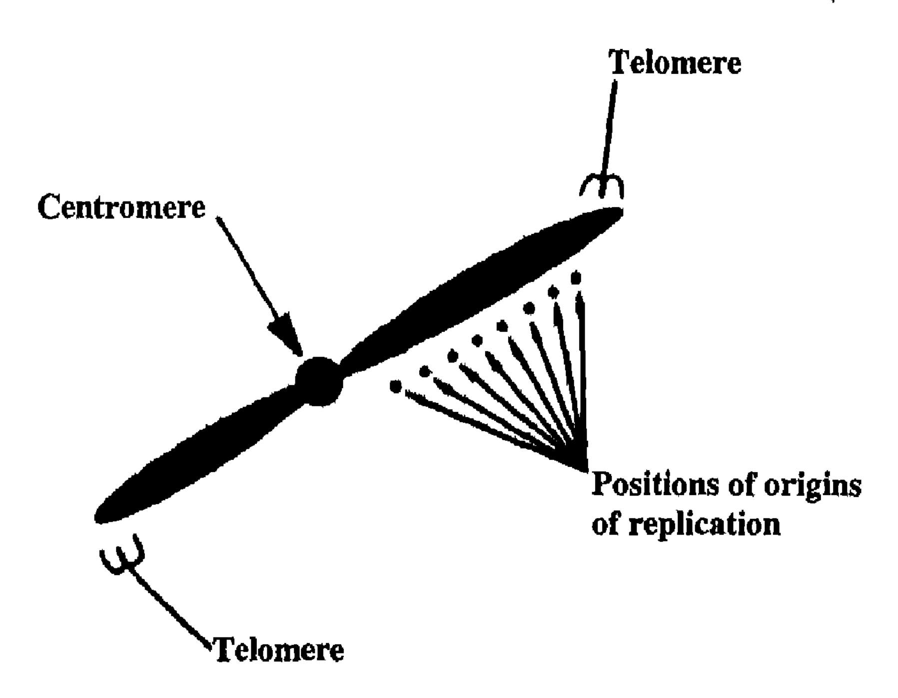
artificial chromosomes وإختصارها BACs. وهذا الناقل الوسيط له قدره إحتواء ونقل عالية حيث يمكنه إحتواء أى أخذ شظايا دنا تصل فى حجمها ٣٠٠ كيلو قاعدة. وهكذا يمكن إختصار كلونات الطاقم الوراثى للإسان إلى ٣٠,٠٠٠ كلون.

تحضير مكاتب الأطقم الوراثية أى الجينومات وذلك بتنقية دنا الكلى ثم عمل هضم جزئى لدنا بواسطة r. e. (restriction digest) وينتج عن ذلك شظايا ذات أحجام يمكن إحتوائها ونقلها فى ناقل وسيط مناسب مثل الفاج لامدا أو كوزميد أو يمكن YAC (شكل ٦٨).



شكل ٦٨: تحضير جين من مكتبة الجينات فى ناقل وسيط عبارة عن كوزميد.

ما هو YAC؟ هو عبارة كرموسوم خميرة صناعى yeast artificial chromosome أى إختصار YAC وهو هام جدا فى عملية توطين الجين. وهذا الإتجاه فى البحث هام جدا لأننا نتجه فى البحث إلى تركيب كروموسومات الكائنات الحية الدقيقة حقيقية النواة eukaryotic chromosomes بدلا من الكائنات الحية الدقيقة أولية النواة. ويجب أن نذكر بعض المعلومات الهامة عن تركيب الكروموسوم فى حقيقيات النواة وهى مايأتى (شكل ٦٩):



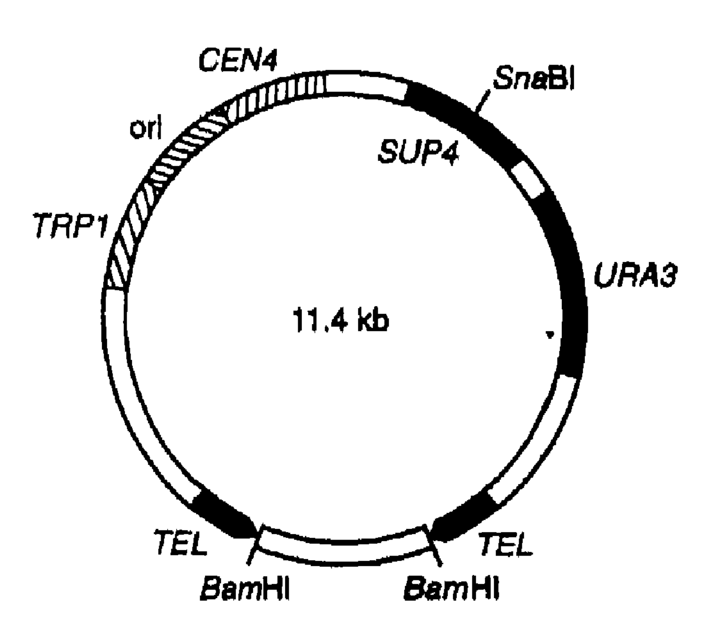
شكل ٦٩: تركيب الكروموسوم (الصبغى).

١ - السنترومير موجود ويتوزع أثناء إنقسام الخلية إلى الخليتين البنويتين.

٢ - نهاية الكروموسوم وهى تحتوى أجزاء تسمى telomeres يوجد فى كل طرف telomere ووظيفتها حماية الكروموسوم من الهدم بواسطة الإنزيمات المحللة الخارجية exonucleases وهى بذلك تساعد تكرار النهايات بإنتظام وتكون سليمة صحيحة.

٣ - موقع أصل ومنشأ التكرار أى تضاعف دنا origins of replication وهى مواقع على الكروموسوم وحيث يحدث بداية تكرار أى تضاعف دنا، ويكون ذلك مماثل أصل ومنشأ تكرار دنا فى البلازميد.

وحيث أن تركيب الكرموسوم تم تحديده بالطريقة السابقة مع تحديد المواصفات السابقة فإن وحدات الكروموسوم يمكن عزلها بواسطة طرق إعادة الصياغة recombinant DNA techniques ثم يتم ربط هذه الوحدات مرة أخرى فى أنبوبة الإختبار وهكذا يتم تكوين كرموسوم تركيبى (صناعى) artificial. وحيث أن جزيئات دنا الموجودة فى الكروموسومات الطبيعية للخميرة عبارة عن عديد من المئات من kb فى الطول، فإنه يمكن فى حالة الكروموسومات الصناعية إحتواء وحمل أجزاء من دنا أكبر بكثير من جزيئات دنا التى تحمل بأى نوع آخر من الناقل الوسيط. أى أنها تحمل أجزاء كبيرة جدا من دنا نسبيا. عامة يوجد عديد من الناقلات الوسيطة YAC ومنها PYAC3 (شكل ٧٠).



شكل ٧٠: ناقل وسيط YAC من النوع pYAC3

وهو لأول مرة وهلة يبدو وكأنه لا يشابه كروموسوم الخميرة الصناعى ولكنه فى الواقع عبارة عن البلازميد pBR322 وقد تم إدخال فيه عديد من جينات الخميرة مثل الجين URA3 والجين TRP1. الشظية أى الجزء الذى يحمل الجين TRP1 يحتوى أيضا موقع منشأ التكرار أى التضاعف origin of replication أى o r i وأن هذه الشظية أو هذا الجزء يحمل تتابعات من النيوكليوتيدات تسمى CEN4 وهى عبارة عن

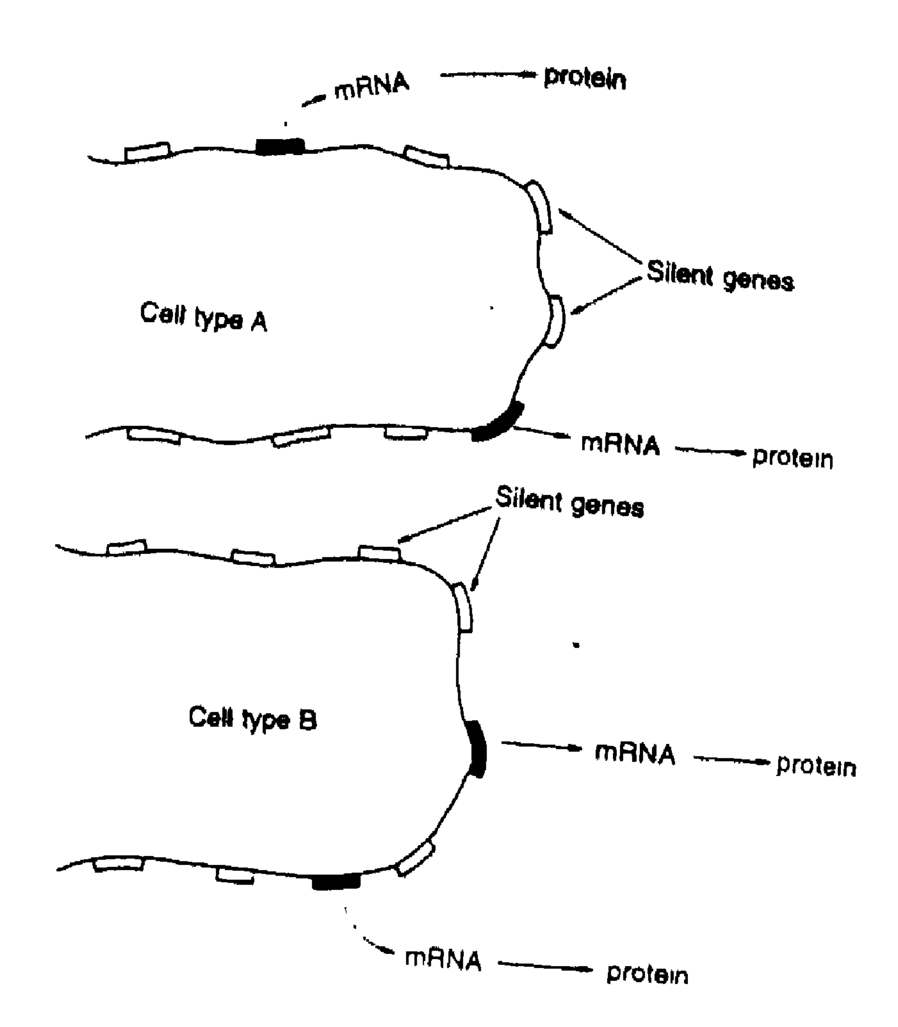
دنا من منطقة السنترومير للكروموسوم رقم ٤. وهكذا فإن موقع منشأ التكرار أى التضاعف وشظية (TRP1-origin-CEN4 fragment) CEN4 تعتبرأن مكونين من ثلاثة مكونات لكرموسوم الخميرة الصناعى. المكون الثالث هو وجود تتابعين أى جزءين كل منهما يسمى TEL. وهما ليست عبارة عن تيلوميرات telomeres كاملة ولكنهما عند وجودهما فى داخل نواة الخميرة يعتبران تتابعات بذرية seeding sequences وهى عبارة عن تتابعات كالبذرة للنبات وحيث ينشأ النبات من البذرة وفى عدم وجود البذرة لا ينشأ النبات فإن هذه التتابعات أى الأجزاء تتابعات بذرية وهى التى يبنى فى وجودها ومنها وعليها التيلوميرات telomeres. أما عن SUP4 فهو عبارة عن معلم إنتخابى selectable marker يتم إدخال دنا جديد فيه أثناء تجارب التوطين. يلاحظ أن Sna B1، Bam H1 هى إنزيمات r. e. لقطع YAC إلى ثلاثة أجزاء.

عامة عدد الكلونات فى مكتبة الطاقم الوراثى للبكتريا والخميرة والفطريات تكون معقولة ويمكن التعامل معها (جدول ٥) ولكن للنباتات الراقية والحيوانات فإن عدد الكلونات كبير جدا ولذلك التعرف على الجين المطلوب مهمة فى غاية الصعوبة، وفى هذه الحالة يمكن إستخدام نوع ثان من المكتبات ليس لكل الكائن ولكن لنوع معين من الخلايا particular cell type وهذه يمكن إستخدامها بسهولة أكثر.

يمكن توطين رنا رسول على هيئة دنا تكميلى mRNA can be cloned as complementery gene.

حيث أنه فى حالة الإنسان أو الحيوان الراقى أو النبات الراقى يتكون من عديد من الخلايا مثل خلايا المخ وخلايا الدم وخلايا الكبد آلخ. جميع هذه الخلايا لها نفس التركيب للصبغيات والجينات ولكن تختلف هذه الخلايا أنه فى زمن معين بعض الجينات فى بعض الخلايا تكون نشطة switched on وفى بعض الخلايا الأخرى تكون هذه الجينات خاملة switched off وعادة يكون العكس صحيح فى جينات أخرى (شكل ٧١).

في حالة وجود عدد قليل من الجينات فقط هو المعبر عن وظيفته وباقي الجينات خاملة غير نشطية وذلك فى خلية معينة يمكن إستعمال mRNA فى عمل مكتبة الجينات. حيث أن الجينات النشيطة المعبرة عن نفسها هى التى ينتج عنها mRNA ويمكن أن يستخدم ذلك فى التعرف على الجينات ومعرفة عدد الجينات النشطة فى الخلية.

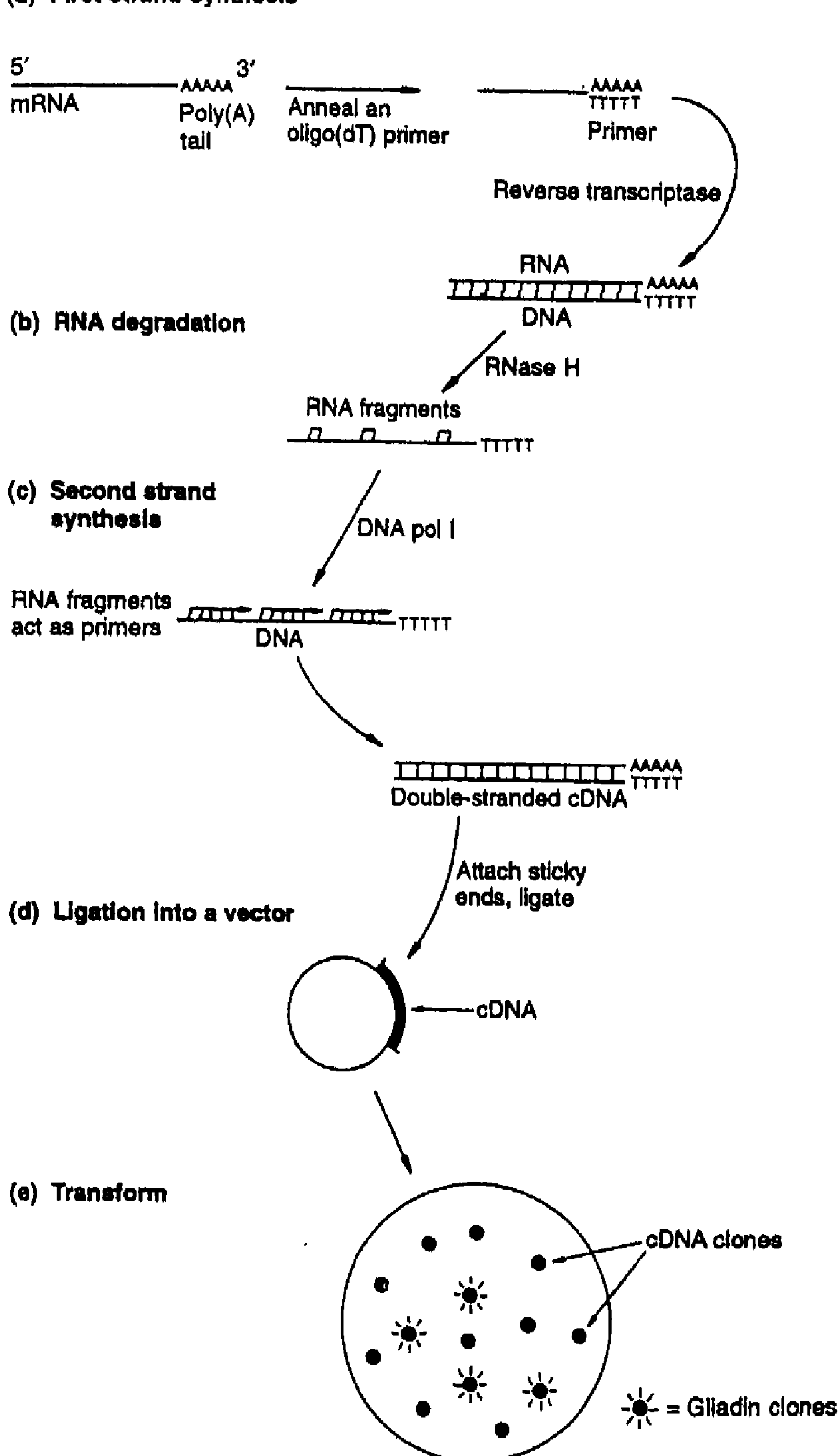


شكل ٧١ : جينات مختلفة تعبر عن وظيفتها فى خلايا مختلفة. أى أن الجينات الموجودة فى الخلية A هى الموجودة فى الخلية B ولكن الجينات التى تعبر عن وظيفتها تختلف فى الخلية A عن الخلية B.

مثال ذلك بروتين الجليادين يوجد بكثرة فى حبوب القمح ولذلك فى أثناء تكوين حبة القمح يتكون الجليادين بكثرة ولذلك فى الخلايا أكثر من ٣٠٪ من مجموع mRNA

الكلى عبارة عن mRNA خاص بالجليادين. ولذلك فى حالة عمل كلونات من mRNA رنا رسول من بذور القمح وهكذا سنحصل على كلونات عديدة خاصة بالجليادين. وبالطبع لا يمكن توطين رنا رسول عند طريق إلتحامه بالناقل الوسيط حيث أنه لا يمكن أن يحدث ذلك ولكن يمكن تحويل رنا رسول إلى دنا تكميلى complementary DNA (cDNA). ومفتاح هذه الطريقة هو إنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase والذى تخلق دنا مكمل لشريط رنا (شكل ٧٢) ثم يتم تحليل شريط رنا بعد ذلك من الشريط الهجين السابق أى شريط رنا وشريط دنا بواسطة إنزيم ريبونيوكلينيز ribonuclease H. بقايا شظايا رنا تعمل primer لإنزيم بلمره دنا رقم ١ والذى يقوم بتخليق دنا المكمل لشريط دنا الأول أى يصبح جزيئ دنا نتيجة لذلك مكون من شريطين أى حلزونى ونتيجة لذلك يمكن لحم جزيئ دنا الجديد فى الناقل الوسيط وتوطينه. وهكذا يمكن حصر جينات الجليادين ومعرفتها عن طريق رنا رسول ودنا التكميلى فى وجود إنزيم النسخ العكسى.

وهكذا تكون كلونات دنا التكميلى cDNA ممثلة لرنا رسول الموجود فى التحضير الأصلى والخاص بالجليادين. وهكذا فإن مكتبة دنا التكميلى الخاصة ببذور القمح تحتوى على نسبة كبيرة من رنا رسول للجليادين. وهكذا يمكن التعرف على جينات الجليادين فى حبوب القمح أثناء عمل مكتبة جينوم القمح. وأن التعرف على الجينات فى هذه الحالة أسهل بكثير من التعرف على هذه الجينات ومن مكتبة الجينوم للقمح.



شكل ٧٢: يوضح عملية توطين دنا تكميلـــى cloning cDNA (أنظـــر الشـــرح فى الكتاب).

طرق التعرف على الكلون
Methods For Clone Identification

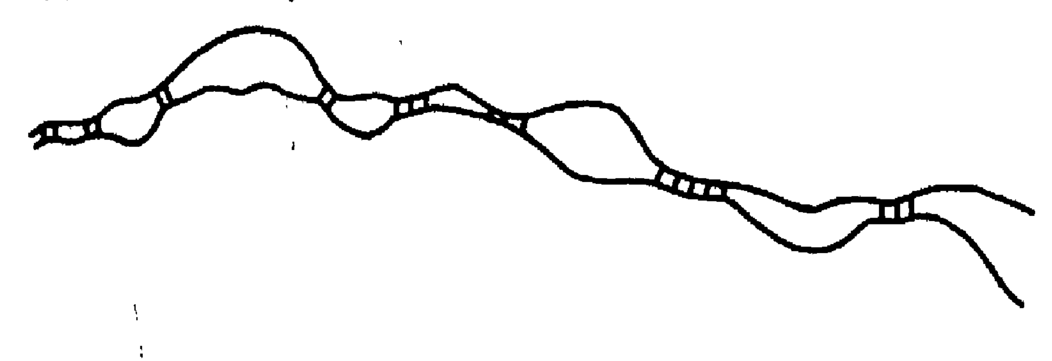
عند تكوين مكتبة جينوم مناسبة فإنه توجد طرق عديدة للتعرف على الكلون المفضل أو المطلوب. قليل من هذه الطرق مبنى أساسا على التعرف على ناتج الترجمة للجين الموطن the translation product of the cloned gene وعادة تكون الطرق الأخرى هى الأسهل وهى التعرف مباشرة على جزيئ دنا المعاد صياغته الصحيح the correct recombinant DNA molecule. يمكن عمل ذلك بواسطة طريقة هامة وهى الجس الهجينى أو التنقيب الهجين hybridization probing.

من المعروف أن أى حلزونين من دنا لهما قدرة أو قابلية للتزاوج أى الإزدواج مع بعضهما. وعندما يكون الحلزونين مختلفين فإن عدد القواعد المزدوجة يكون قليل ويكون جزيئ دنا الهجين غير ثابت. ولكن عندما يكون الحلزونين متوافقين يحدث التزاوج بين جميع أو أغلب القواعد ليتكون جزيئ دنا هجين ثابت. يمكن أن يحدث ماسبق أيضا بين حلزون دنا وشريط رنا متكاملين (شكل ٧٣) ولذلك فإنه يمكن التعرف على كلون معاد صياغته عند وجود مجس لرنا أو لدنا ويكون هذا المجس أى المنقب مكمل للجين المطلوب التعرف عليه.

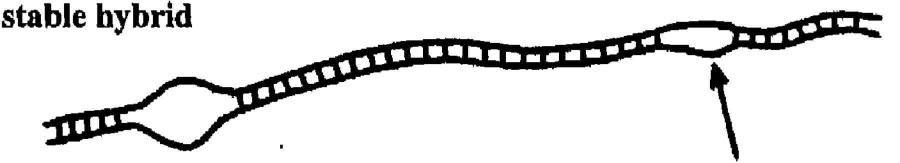
يمكن إستعمال الجس الهجينى أى التنقيب الهجينى للتعرف على دنا المعاد صياغته فى خلايا البكتريا وبليكات plaques الفاج. والحقيقة أن طرق رائعة فى هذا الصدد قد أكتشفت أثناء السبعينيات ولذلك ليس من الضرورى تنقية دنا المعاد صياغته بل يمكن عمل جس مباشر للتحضير in situ probing. وفى هذه الحالة (شكل ٧٤) يتم نقل مستعمرات البكتريا أو البليكات إلى غشاء نيتروسيلليلوز أو نيلون ثم تعامل لإزالة جميع الأجزاء الملوثة عدا دنا وذلك بمعاملة المستعمرات بمركب قلوى وإنزيم البروتييز وعادة تسبب هذه المعاملة دنترة جزيئات دنا ولذلك فإن الروابط الإيدروجينية بين

حلزونى دنا فى جزيئ دنا يتم تكسيرها. يمكن بعد ذلك إحكام ربط ولصق حلزونات دنا المنفردة بالغشاء وذلك بتعريض الغشاء بما عليه إلى درجة حرارة ٨٠ مئوية لمدة قصيرة فى حالة إستعمال غشاء نيتروسيلليلوز أو التعريض للأشعة فوق البنفسجية عند أستعمال غشاء نيلون.

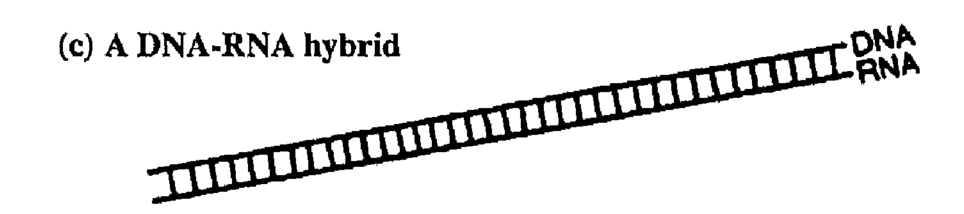
(a) An unstable hybrid



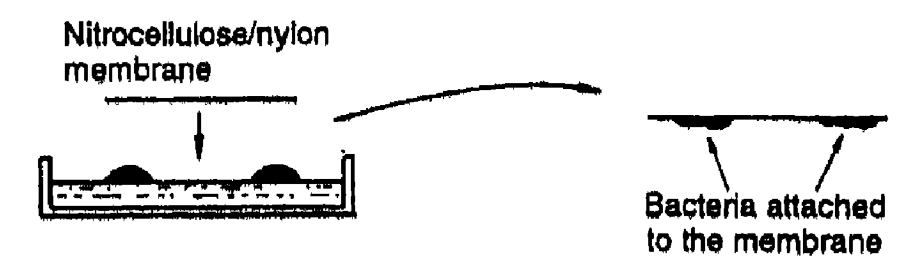
(b) A stable hybrid

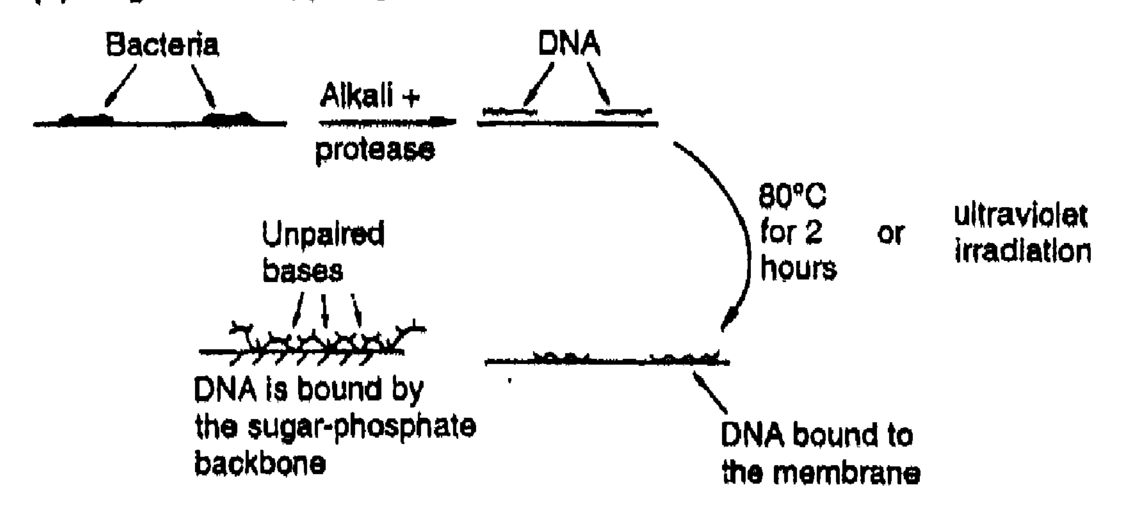


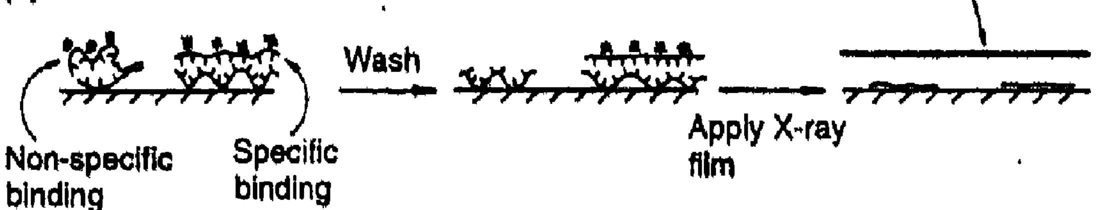
(c) A DNA-RNA hybrid

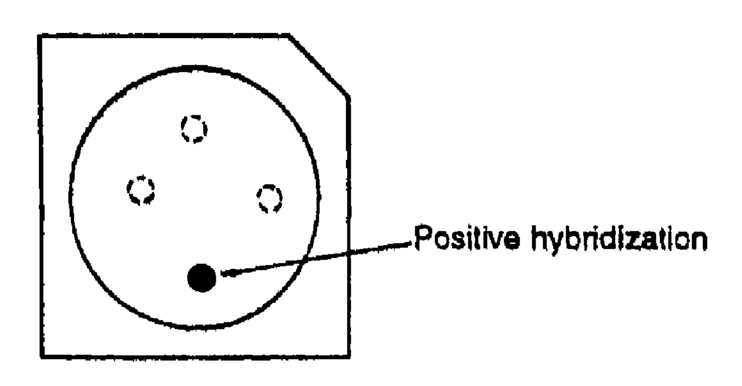


شكل ٧٣: تهجين الأحماض النووية Nucleic acid hybridization. (a) هجين غير ثابت بين حلزونى دنا غير متماثلين، (b) هجين ثابت بين حلزونى دنا متماثلين عدا أجزاء قصيرة، (c) هجين بين دنا ورنا.









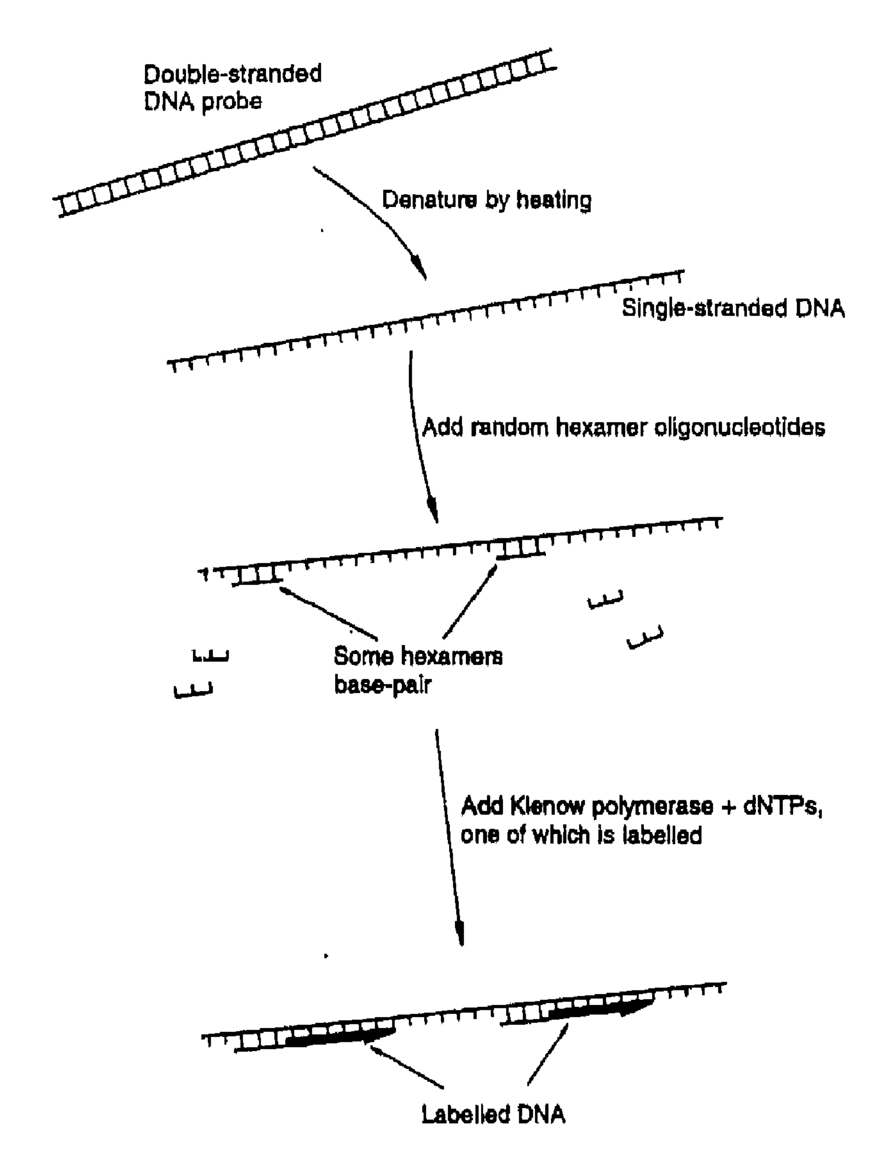
شكل ٧٤: الجس الهجينى أى التنقيب الهجينى للمستعمرات **colony hybridization** وذلك بواسطة مجسات معلمة مشعة (الشرح بالكتاب).

وفى هذه الحالة فإن الجزيئات تكون ملتصقة بالغشاء عن طريق العمود الفقرى لجزيئ دنا وهو عمود سكر فوسفات ولذلك ستكون القواعد حرة لكى تزدوج أى تكمل جزيئ آخر أى حلزون آخر من دنا. لابد فى هذه الحالة من أستعمال منقب أى مجس معلم بالأشعاع ومدنتر بالحرارة ويتم إضافته إلى الغشاء فى محلول من الكيماويات والتى تشجع عملية التهجين بين القواعد أى بين الأحماض النووية. وبعد فترة مناسبة لحدوث التهجين. فإن الغشاء يتم غسله لأزالة المجس الغير مرتبط ثم يجفف ثم يتم التعرف على المجس المرتبط بواسطة التصوير بأشعة X.

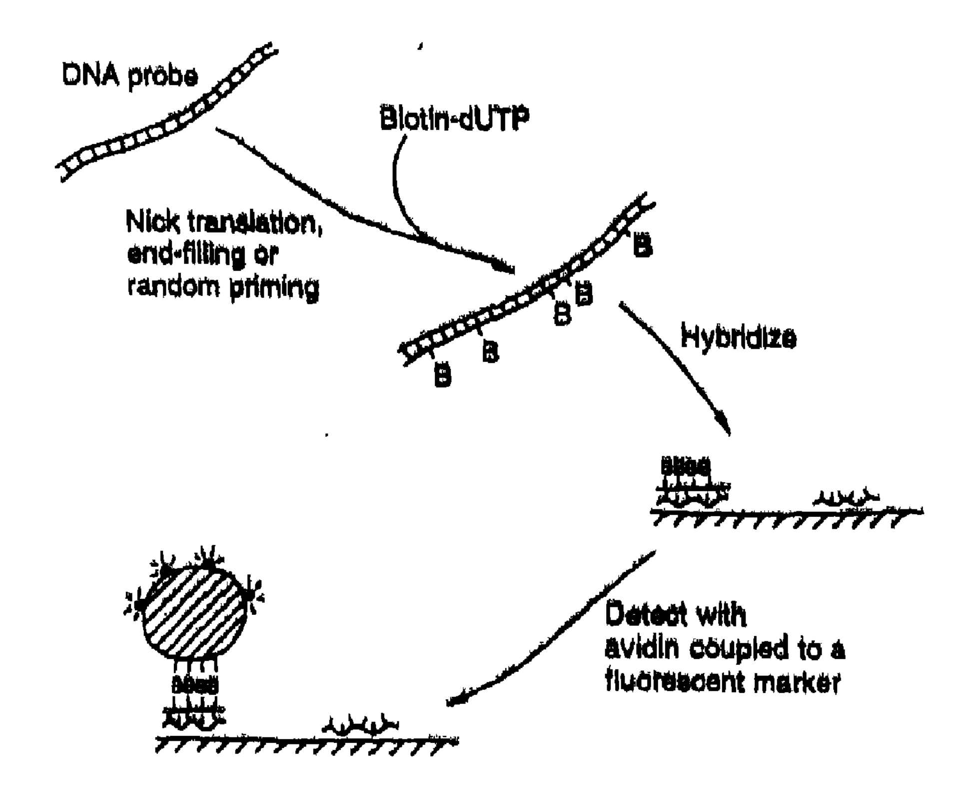
يمكن تعليم المجس أن المنقب المستعمل بالنيوكليوتيد المشع بواسطة ترجمة القطع nick translation أو بملأ النهايات end filling ولكن توجد طريقة أفضل من الطريقتين السابقتين وهى البداية العشوائية (شكل ٧٥) random priming حيث يكون المجس الناتج عال النشاط وبالتالى يمكنه التعرف على كميات صغيرة جدا من دنا المرتبط بالغشاء. وفى جميع الطرق السابقة يتم التعرف على مكان التهجين بين المجس ودنا المطلوب بواسطة التصوير الأشعاعى الذاتى autoradiography. ولكن عامة فإن جميع التجارب المستعمل فيها عناصر مشعة غير مرغوبة حاليا لخطورتها على القائمين بها وصعوبة التخلص من نفاياتها. ولذلك فإن المجس يمكن تعليمه بمعلم غير مشع. توجد طرق عديدة لذلك منها طريقتين (شكل ٧٦) وهما طريقة النيوكليوتيد البيوتينى biotinylated nucleotide والطريقة الثانية هى طريقة بيروكسيديز فجل الحصان horseradish peroxidase.

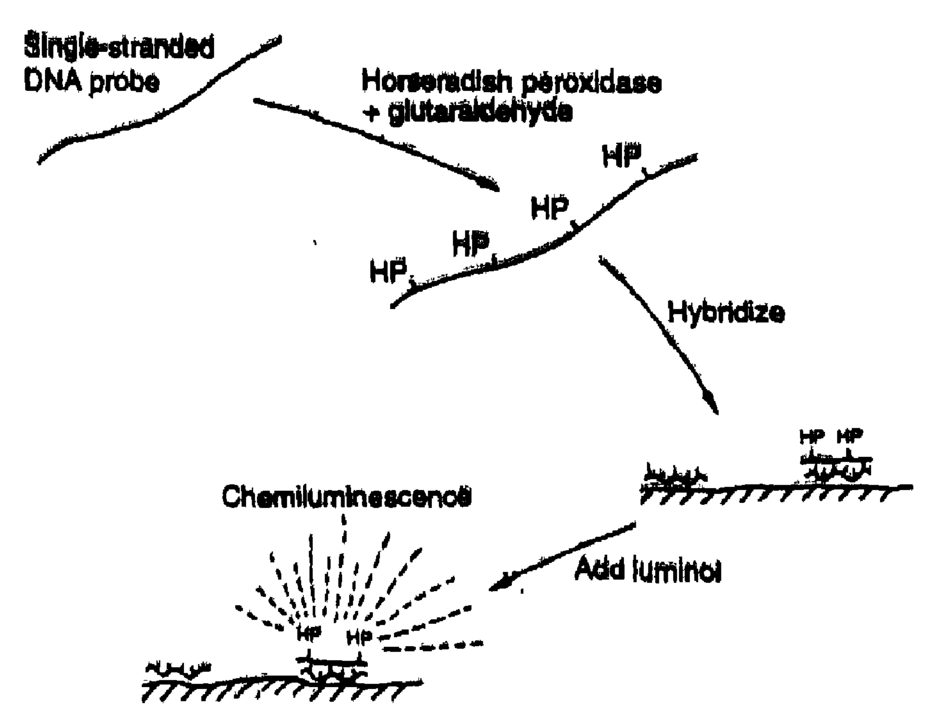
فى الطريقة الأولى وهى biotinylated nucleotide وفيها تستخدم نيوكليوتيدات dUTP محور بأن يضاف إليه بيوتين ويصبح biotin- dUTP وهو عبارة عن جزيئ عضوى له جاذبية شديدة لنوع خاص من البروتينات يسمى أفيدين avidin. وبعد التهجين فإنه يمكن التعرف على مواقع المجس البيوتينيلاتد المرتبط bound biotinylated probe وذلك بالغسيل بالأفيدين المرتبط مع معلم فلورسنتى fluorescent marker. هذه الطريقة فعالة للجس بالمواد المشعة radioactive probing وأصبحت

مفضلة بشدة الآن. أما فى الطريقة الثانية وهى horseradish peroxidase حيث أنه تم عمل مركب معقد من مجس دنا DNA probe مع إنزيم بيروكسيديز فجل الحصان ثم يتم عمل التهجين ثم إضافة luminol، ويتم التعرف عليه من خلال قدرة الإنزيم لتحليل ليومينول luminol ويحدث قذف إشعاعى chemiluminescence. وأن هذه العلامة أى الأشعاع يمكن إثباتها وتسجيلها بواسطة فيلم فوتوجراف عادى وتماثل هذه الطريقة المعروفة بإسم autoradiography.



شكل ٧٥: طريقة البداية العشوائية random priming لتعليم دنا. دنترة بـــالحرارة ثم وجود حلزون مفرد ثم إضافة قليل النيوكليوتيدات السداســـى عشـــوائيا add random hexamer oligonucleotides بعض النيوكليوتيدات السداسية يحدث لها تـــزاوج -base pair ثم إضافة klenow polymerase مع d NTPs إحداها مشع.





شكل ٧٦: طريقتين لتعليم مجسات دنا بطــرق غــير مشــعة. Non- radio active labelling of DNA probes

أمثلة عملية لإستخدام الجس الهجينى

Examples of the practical use of hybridization probing:

من الواضح أن نجاح عملية التهجين للمستعمرة أو البليكات plaques (colony or plaque hybridization) كأداة للتعرف على جزيئ دنا معاد صياغته متوقفة تماما على وجود جزء من جزيئ دنا يستخدم كمجس. هذا المجس يشارك فى جزء على الأقل من تتابع القواعد فى الجين الموطن. نفترض أن الجين غير متاح وأن المطلوب عمل تجربة لتوطينه فما هو الذى يمكن إستعماله كمجس.

عمليا طبيعة المجس تحدد بواسطة المعلومات المعروفة عن الجين المطلوب وسنأخذ فى الإعتبار ثلاثة ملاحظات وهى:

١ - أين يعبر الجين عن وظيفته gene expression بتركيز مرتفع؟ فإنه يكون فى نوع معين من الخلايا ومن هذه الخلايا يمكن تحضير دنا تكميلى cDNA ويمكن تحضير وعمل مكاتب من ذلك cDNA clone library.

٢ - عندما يكون تتابع الأحماض الأمينية فى بروتين معين معروف جزئيا أو تماما وأن يكون هذا البروتين ناتج عن جين معين معروف محدد.

٣ - عندما يكون الجين أحد الجينات فى عائلة جينات واحدة وحيث تكون الجينات قريبة التركيب والصلة ببعضها.

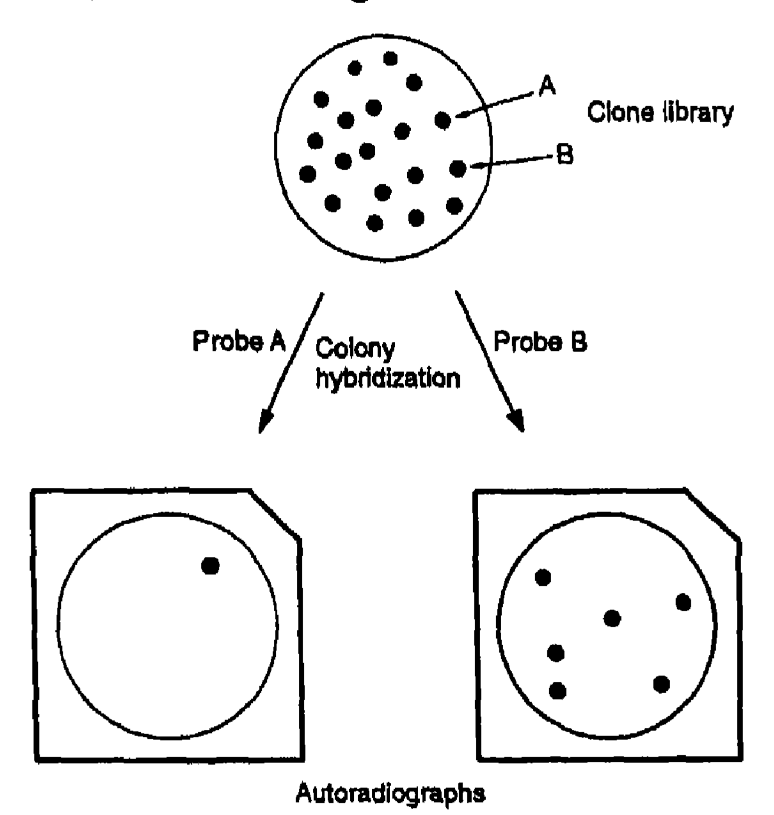
أ - درجة التعدد فى الجس لمعرفة تركيب مكتبة cDNA:

Abundancy probing to analyse a cDNA library

قد تم شرح ذلك فى مثال سابق وحيث أن مكتبة دنا تكميلى cDNA library يتم تحضيرها للحصول على تركيب الجين a chone of a gene (نسخ للجين). وحيث أن هذا النسخ أو التركيب للجين يتم التعبير عنه على مستوى عال أى بشدة فى نوع معين من الخلايا. وفى مثال مكتبة دنا تكميلى من حبوب القمح، فإن نسبة كبيرة من هذه النسخ تكون من منسوخ رنا رسول mRNA transcripts لجين الجليادين فى القمح.

من السهل التعرف على نسخ جينات الجليادين gliadin clones فى حالة إستخدام أنواع من دنا تكميلى عديدة cDNAs منفردة من المكتبة لتجس وتنقب جميع نسخ الجينات الأخرى فى المكتبة (شكل ٧٧).

يتم إختياره كلون a clone عشوائيا ويتم تنقية دنا المعاد صياغته منها ثم تعليمه ثم يستخدم لجس بقية الكلونات. يتم تكرار ذلك مع الكلونات المختلفة different clones وهى تعمل كمجس فى كل حالة وهكذا حتى أن واحدة من هذه المجسات يتم تهجينها مع عدد كبير نسبيا من مستوطنات المكتبة. هذا الدنا التكميلى الموجود بكثرة فى الكلونات السابقة يمكن أن يكون للجليادين gliadin clone ويتم العمل عليه بدقة وبتركيز للتأكد من صحة تعريفه. كيف يتم التعرف عليه؟ يكون ذلك بواسطة إختبار تتابع دنا DNA sequencing وأيضا بواسطة عزل نواتج الترجمة translation product.



شكل ٧٧: الجس (التنقيب) فى داخل المكتبة للتعرف على الكلون (مستوطنة) الموجودة بكثرة أى الموجودة بتكرارية عالية.

ب – مجسات قليلة النيوكليوتيدات للجينات ذات ترجمة لنواتج معروفة:

Oligonucleotide probes for genes whose translation products have been characterized

عادة الجين تحت الدراسة والمطلوب توطينه يعبر عن وظيفته بتكوين بروتين معين وهذا البروتين المعين يكون قد درس ببعض التفصيل. تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين يتم التعرف عليه باستخدام طرق التعاقب **sequencing techniques** والتى هى مستخدمة منذ ما يزيد عن ٣٥ عام. لو أن تعاقب الأحماض الأمينية معروف فإنه يكون من الممكن إستخدام الشفرة والشفرات الوراثية **genetic code** لكى نتكهن بتتابع النيوكليوتيدات فى الجين تحت الدراسة. هذا التكهن يكون دائما تقريبى حيث أن الميثيونين والتربتوفان يتم تكوينها بكودون واحد لكل منهما وهو **UGG** للتربتوفان، **AUG** للميثونين. أما فى حالة الأحماض الأمينية الأخرى فإنه يتم تكوينها بكودين على الأقل لكل حامض أمينى. على أى حال فى أغلب الحالات فإن الكودونات المختلفة للحامض الأمينى الواحد تكون متقاربة مع بعضها (ذات صلة **are related**). مثال ذلك الحامض الأمينى ألانين يمكن تشفيره (**coded**) بواسطة **GCA**، **GCT**، **GCC**،**GCG** وهكذا فإنه يمكن التأكد أن الألانين يدخل فى تركيبه **GC** مشتركة فى الأربعة كودونات وفى نفس الموقع ولذلك فإن الكودونات تكون متقاربة.

وفيما يلى مثال يوضح كيفية حدوث وإنجاز هذه التكهنات بتركيب دنا. مثال ذلك سيتوكروم c وهو عبارة عن بروتين وله دور هام فى التنفس الهوائى للكائنات الحية. ولقد تم عمل تتابع الأحماض الأمينية فى بروتين سيتوكروم c فى عام ١٩٦٣ (شكل ٧٨).

فى هذا التتابع يلاحظ وجود جزء أى قطعة تبدأ بالحامض الأمينى رقم ٥٩ وهى تركيبها **Trp- Asp- Glu- Asn- Asn-Met**. فإن الشفرة الوراثية توضح أن هذا الببتيد

السداس hexapeptide يتم تكوينه بواسطة تتابع النيوكليوتيدات كالآتى:

$$TGG\text{-}\ GA^{T}_{C}\text{-}\ GA^{A}_{G}\text{-}\ AA^{T}_{C}\text{-}\ AA^{T}_{C}\text{-}ATG$$

GLY–SER–ALA–LYS–LYS–GLY–ALA–THR–LEU–PHE–LYS–THR–ARG–CYS–GLU–[15]
LEU–CYS–HIS–THR–VAL–GLU–LYS–GLY–GLY–PRO–HIS–LYS–VAL–GLY–PRO–[30]
ASN–LEU–HIS–GLY–ILE–PHE–GLY–ARG–HIS–SER–GLY–GLN–ALA–GLN–GLY–[45]
TYR–SER–TYR–THR–ASP–ALA–ASN–ILE–LYS–LYS–ASN–VAL–LEU–TRP–ASP–[60]
GLU–ASN–ASN–MET–SER–GLU–TYR–LEU–THR–ASN–PRO–LYS–LYS–TYR–ILE–[75]
PRO–GLY–THR–LYS–MET–ALA–PHE–GLY–GLY–LEU–LYS–LYS–GLU–LYS–ASP–[90]
ARG–ASN–ASP–LEU–ILE–THR–TYR–LEU–LYS–LYS–ALA–CYS–GLU[103]

شكل ٧٨: تتابع الأحماض الأمينية فى سيتوكروم c فى الخميرة.

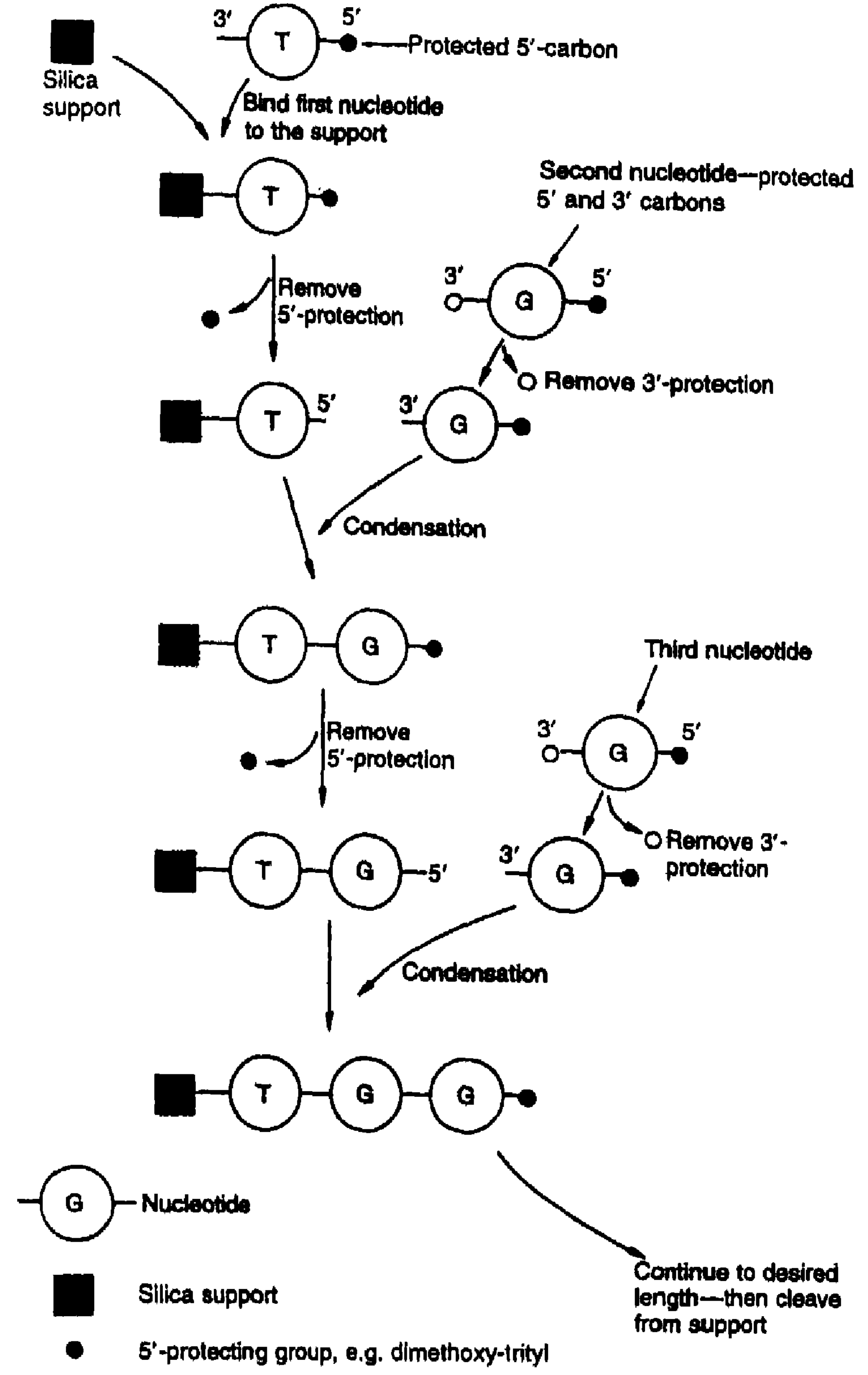
وهكذا من الحالة السابقة يمكن أن يتكون ١٦ حالة من تتابعات القواعد المختلفة 16 different possible sequences. كان معرفة هذا التتابع أكاديميا لعديد من السنوات ولكن تغير الوضع حديثا حيث أن سلاسل من قليل النيوكليوتيدات قصيرة short oligonucleatides يمكن تخليقها في المعمل (شكل ٧٩). وهكذا يمكن تخليق مجس يتكون من قليل من النيوكليوتيدات صناعيا تبعا لترتيب النيوكليوتيدات المتكهن بها، وهكذا يمكن لهذا المجس أن يحدد الجين المسئول عن تخليق البروتين تحت الدراسة. وفي حالة سيتوكروم c للخميرة، فإن ١٦ نيوكليوتيدات قصيرة مختلفة يمكن تخليقها وأن ١٤ نيوكليوتيده مؤكد وجودها من ١٨ نيوكليوتيده، والتى يمكن أن يتكون منها Trp- Asp- Glu- Asn- Asn-Met وقد تكون هذه النيوكليوتيدات القصيرة منفردة أو فى مجموعة، ثم تستخدم لجس الطاقم الوراثى للخميرة أى أو مكتبة دنا التكميلي cDNA library (شكل ٨٠). فإن المجس سيوضح التماثل والتوافق بين بعض النيوكليوتيدات مع جين سيتوكروم C وهذه تكون علامة واضحة لحدوث التهجين بينهما. سنفترض أن أكثر من مستوطنة clone أعطت نفس النتيجة فإن يجب إعادة الجس بإستخدام مجس ثان له تركيب من قليل النيوكليوتيدات مخالف

للسابق ولكن من نفس مجموعة قليل النيوكلوتيدات المحتملة السابق ذكرها وبعمل الجس الثانى وحدوث نفس النتيجة لمستوطنة معينة فإن هذا دليل على أن التعرف وتعريف المستوطنة clone صحيح تماما (شكل ٨٠). عند إختيار قطعة أو جزء أو شظية البروتين المراد إختبارها يجب أن يكون بدقة وبعناية وبحيث يكون عدد قليل النيوكليوتيدات قليل أو معقول نسبيا مثل المثال السابق وهو ١٦. أما فى حالة أخرى تكون صعبة جدا أو مستحيلة فمثلا لو إخترت التتابع لببتيد سداسى hexapeptide مثل Ser- Glu- Tyr- Leu- Thr-Asn وهو التتابع يلى التتابع السابق مباشرة أى يلى المثال السابق فإن عدد قليل النيوكليوتيدات الناتجة من هذا الببتيد تكون عدة آلاف وهى مختلفة فى تتابع الـ ١٨ نيوكليوتيدة أى يوجد آلاف مختلفة من هذه التتابعات وبالتالى سيكون إختيار غير مناسب لعمل مجسات صناعية. ولذلك فإن المثال الأول ممتاز والمثال الثانى غير عملى إطلاقا.

جـ- الجس المتباين المختلط للتعرف على وتحديد الجينات المتقاربة:

Heterologous Probing allow related genes to be identified

عادة كميات كبيرة نسبيا من التوافق homology بين النيوكليوتيدات يمكن حدوثه عندما يوجد جينان مسئولين عن تكوين بروتين واحد، وأحد هذين الجينين موجود فى كائن والآخر موجود في كائن آخر. يعتبر ذلك دليل على أن التطور يحافظ على تركيب الجين مع وجود بعض الإختلافات الغير جوهرية. عادة يكون المجس وحيد الشريط single- stranded probe يكون متماثل تماما أو كثيرا مع جينين يقوما بنفس الوظيفة في كائنين متقاربين، أو بالطبع يكون لأكثر من جينين في كائنات متقاربة. حيث أن المجس وحيد الشريط المحضر من جين يتوافق تماما أو كثيرا مع نفس الجين أو الجينات فى كائنات متقاربة ويكون معهم stable hybrid. وبالرغم من أن التماثل التام غير موجود فإن إستخدام خيطين أى شريطين منفردين من كل كائن لنفس الجين ينتج عنه هجين ثابت stable hybrid أى تركيب ثابت stable structure (شكل ٨١).



شكل ٧٩: شكل مبسط لخطوات تخليق قليل النيوكليوتيدات. المجاميع الواقيـــة protecting groups مرتبطة بالنهايتين 3 '5 وتمنع التفاعـــل بـــين وحيـــدات النيكليوتيـــدات individual mononucleotides. بالتحكم في الزمن بدقة والخاص بإزالة المجاميع الواقية. يمكن إضافة وحيدات النيوكليوتيدات واحدة تلو الأخرى إلى قليل النيوكلوتيدات المطلوب زيادقما في الطول.

Synthetic, end-labelled oligonucleotides

Gene library of yeast DNA

Colony hybridization probing

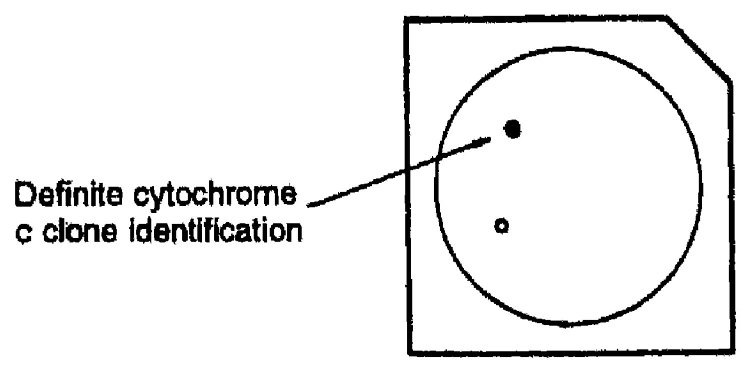
Oligonucleotides hybridize to cytochrome c clone

Autoradiography

Probable cytochrome c clone

Non-specific signal?

Reprobe with second predicted oligonucleotide

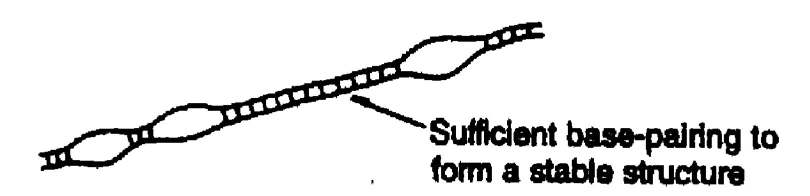


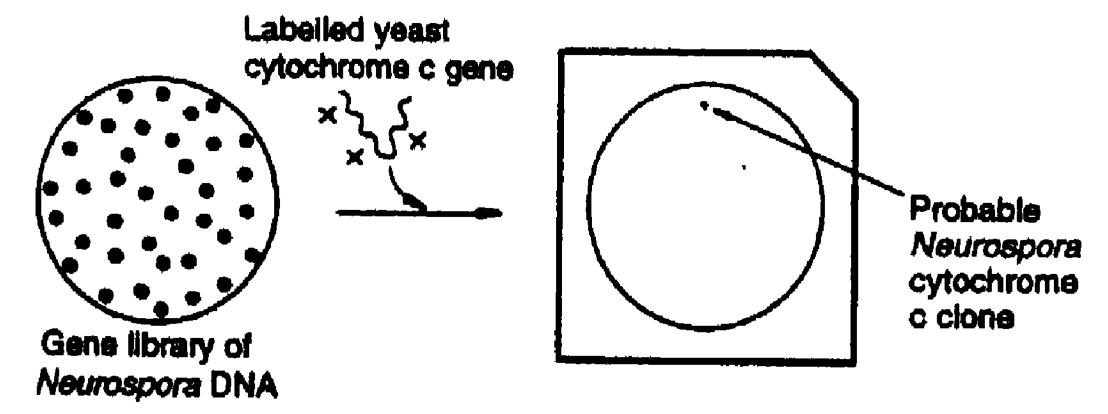
شكل ٨٠: إستخدام قليل النيوكليوتيدات التـــركيبي ذو النهايـــة المعلمـــة a system end-labelled oligonucleotides وذلك للتعرف على المستوطنة a clone المطلوبـــة الحاويـــة لجـــين سيتوكروم c فى الخميرة.

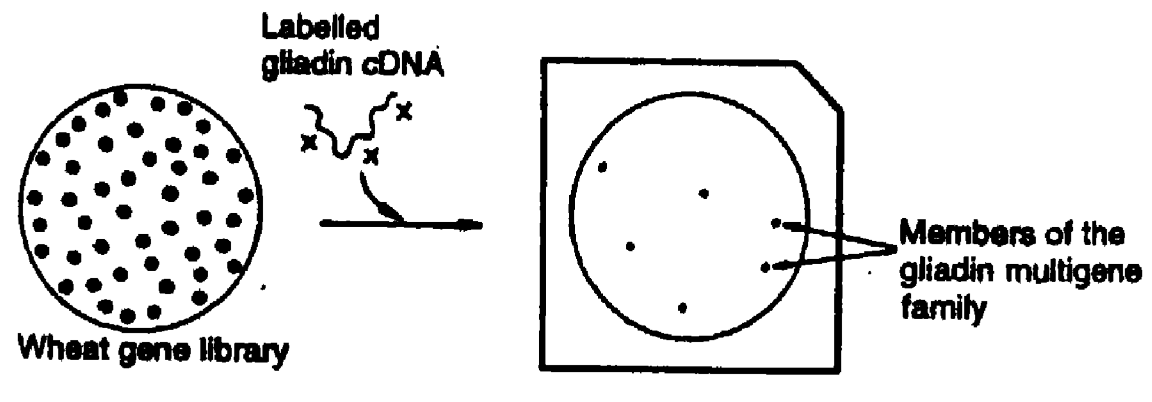
يستخدم أيضا الجس المتباين أى المخـتلط heterologous probing فـى عمـل وتعظيم عملية التهجين بين تتابعين أو أكثر لتعريف المستوطنة. ومثال ذلك أن جـين سيتوكروم c فى الخميرة أمكن التعرف عليه كما سبق شرحه فـى الجـزء السـابق بإستخدام قليل النيوكلوتيدات، فإن هذا الجين أى دنا الجين يمكن أن يستخدم المجس الخاص به وهذا المجس يمكن أن يهجن مع دنا جين آخر مماثل أو متشابه وبالتـالى فإن المجس الناتج من جين الخميرة يمكن أن يستخدم فـى التعـرف علـى جينـات سيتوكروم c فى مكاتب المستوطنات clone libraries لكائنات حيـة أخـرى. أى أن المجس المحضر من جين الخميرة سيكون متكامل إلى حد كبير جـدا - وعـادة لا يكون متماثل - مع نفس الجين فى الفطر Neurospore crassa. ونتيجة لذلك يحدث تزاوج بين القواعد بدرجة كبيرة كافية ويتكون هجين ثابت يمكـن إثبـات وجـوده بطريقة autoradiography (شكل ٨١). يجب الأخذ فى الإعتبار فى هذه الحالة أنـه لابد من توافر ظروف وعوامل بيئية خاصة وتحوير لظروف معينة للحصـول علـى هجين ثابت يستمر حتى التصوير لأنه أحيانا تحدث حالة عـدم ثبـات destabilized ويفك قبل التصوير.

يمكن أيضا للجس المتباين أن يعرف الجينات المتقاربة والتى توجد فـى عائلـة واحدة gene family فى نفس الكائن. مثال ذلك جليادين القمح وقد تـم فيمـا سـبق شرح كيفية الحصول على مستوطنة لجينات الجليادين بواسـطة طريقـة التكراريـة العالية للجس بإستخدام دنا تكميلى cDNA، ووجد من هذه الطريقـة أن دنا التكميلى لا يتوافق ويهجن الجين الخاص به فقط ولكن يحدث ذلك فى عديـد مـن الجينـات الأخرى المتقاربة له بالطبع (شكل ٨١). هذه الجينات جميعها تكون لها علاقة وثيقة بدنا تكميلى الجليادين gliadin cDNA وهى بالطبـع جميعها متشـابهة لحـد كبيـر وعادة لا تكون متماثلة حيث يوجد إختلاف طفيف فى تتابع النيوكليوتيـدات الخـاص بكل جين. من المعروف أن جليادينات القمـــح wheat gliadins تتكـون مجموعـة

مركبة من بروتينات مختلفة متقاربة والتى يمكن أن تتحكم فيها عديد مـــن الجينـــات المتقاربة وتسمى هذه بعائلة الجينات أو عائلة عديـــد الجينـــات multigene family. وفى هذه الحالة لو أن جين واحد منها تم توطينه cloned فإن جميع الجينات الباقيـــة من نفس العائلة يمكن التعرف عليها بسهولة بطريقة الجـــس (التنقيـــب) المتبـــاين (المختلط).







شكل ٨١: الجس المتباين (التنقيب المتباين أو المختلط)

طرق معتمدة على إستعمال مركبات ناتجة عن النسخ للتعرف على الجين الموطن

Identification Methods Based On Detection Of The Translation Product Of The Cloned Gene

يعتبر الجس الهجينى hybridization probing الطريقة المثالية المفضلة فى التعرف على دنا معين معاد صياغته من مكتبة الكلونات أى مكتبة المستوطنات. يمكن عمل الإختبار بسهولة ويسر وحديثا مع بعض التحسينات فى الطريقة يمكن إختبار عشرة آلاف حالة من دنا معاد صياغته لكل تجربة وبذلك يتم الكشف عن مكاتب الجينومات الكبيرة فى وقت قصير نسبيا. ولكن أساس هذه الطريقة هى وجود مجسات أى تخليق مجسات مناسبة ثم عمل تهجين ولكن أحيانا يصعب أو يكون من المستحيل إستخدام التهجين فى التعريف ولذلك نلجأ للطرق السيريولوجية وبالتالى يتم عمل مسح وإنتخاب سيريولوجى immunological screening. بالطبع فى حالة الجس الهجينى يتم تعريف شظية دنا الموطنة ذاتها والتعرف عليها ذاتها ولكن العكس صحيح فى الطرق السيريولوجية حيث يتم التعرف على البروتين الناتج عن نشاط الجين وليست على الجين نفسه.

شرح للسيريولوجى والطرق السيريولوجية :

يوجد علم خاص يسمى serology وهو عبارة عن العلم الذى يدرس serum سيرم الدم – ومن الأسس الهامة لدراسة هذا العلم الأنتجن antigen والأجسام المضادة antibodies. يعرف الأنتجن بأنه أى مركب أو مادة أو جزء يحقن فى أنسجة حيوان من الثدييات ينشط تكوين أجسام مضادة فى دم هذا الحيوان. وهذه الأجسام المضادة تعطى الإنسان أو الحيوان مناعة immunity ضد البكتريا والفيرس وغيرها والتى تسبب أمراض للإنسان والحيوان ولذلك يسمى علم المناعة immunology.

يعرف الجسم المضاد بأنه عبارة عن بروتين الجلوبيولين globulin والذى ينتج نتيجة لحقن الأنتجن فى جسم الحيوان والذى يمكن أن يتفاعل مع الأنتجن بطرق عديدة وشكله حرف Y.

لكى تحدث التفاعلات العديدة بين الأنتجين والأجسام المضادة فلابد أن يرتبطا ببعضهما (شكل ٨٢) أولا ويكون ذلك فى مواقع أرتباط combining sites أو epitopes محددة على كل من الأنتجين والجسم المضاد. عادة تكون مواقع الأرتباط على الجسم المضاد إثنين وتكون عديدة على الأنتجين وكلما كبر حجم الأنتجين كلما زاد عدد مواقع الأرتباط. بعد حدوث الأرتباط تحدث أحد الحالات الآتية ويتوقف ذلك على طبيعة كل من الأنتجين والجسم المضاد وهى الترسيب precipitation والتجمع agglutination والتحلل lysis ومعادلة تأثير السم toxin neutralization وتسهيل مهاجمة وقتل الخلايا الغريبة opsonization. وفى حالة الترسيب يحدث تكون راسب يمكن رؤيته بالعين المجردة وذلك عند خلط الأنتجين بالسيرم المضاد antiserum المحتوى على الأجسام المضادة. يمكن قياس الراسب كميا بجهاز مثل Libby photronreflectometer. وفى حالة التجمع يحدث تجمع للأنتجين فى مجاميع وفى حالة التحلل يحدث قتل أو تحلل لخلايا البكتريا وفى حالة معادلة السموم تتفاعل الأجسام المضادة مع السم الموجود فى الجسم وبحيث تمنع تأثيره السام وذلك قد يكون بالتأثير على المجاميع السامة فى جزيئ السم وتصبح غير سامة أو غير مؤثرة وذلك بتحوير أو بتغيير تركيب هذه المجاميع السامة أو الأرتباط بها وتغطيتها. وفى حالة opsonization أنه عند ارتباط أجسام مضادة أو جسم مضاد بسطح خلية بكتيرية فإن هذه الخلية البكتيرية تصبح قابلة لأن تهاجم وتقتل بواسطة خلايا phagocytes وفى عدم وجود الأجسام المضادة تصبح هذه الخلية البكتيرية مقاومة فلا يمكن لخلايا phagocytes أن تهاجمها أو تهاجمها بصعوبة أى أن الأجسام المضادة تسهل عملية الهجوم. توجد أنواع عديدة من خلايا phagocytes فى جسم

الحيوان والإنسان تستطيع أن تهاجم وتقتل وتحلل البكتريا الغريبة عن الجسم ومثال ذلك بعض خلايا الكبد وبعض الخلايا الطلائية وبعض خلايا العقد الليمفاوية lymph nodes.

الأنتجين عادة يكون بروتين وقد يكون مركب عديد التسكر أو دهون معقدة أو مركبات أخرى مرتبطة بالبروتين. ويتميز الأنتجين بميزة أخرى هامة وهو لابد أن يكون غريب عن جسم الحيوان والإنسان كما يتميز أيضا بأن يكون وزنه الجزيئى كبير نسبيا فمثلا كحول الميثيل أو الأيثيل غريب عن الجسم ولكن لأن وزنه الجزيئى منخفض لا يعتبر أنتجن. وقد ثبت أن كثيرا من الأنتيجينات تتكون من أكثر من جزء وأن الجزء المسئول عن تخصص الأنتجين يمكن أن ينفصل عن الجزء الخاص بالقدرة على تنبيه تكوين الأجسام المضادة وعلى ذلك فإن الأنتيجينات التى تمتلك الجزء الخاص المسئول عن تخصص الأنتيجين وكذلك الجزء الخاص بالقدرة على تنبيه إنتاج الأجسام المضادة يسمى أنتيجين كامل complete antigen وهى غالبا مركبات تحتوى على تركيب كيماوى معقد ذو وزن جزيئى مرتفع غالبا أكثر من ١٠٠٠٠ دالتون وبعضها حوالى ٦ ملايين دالتون. ومثل هذه المركبات يمكن أن تنشق وأن الجزء المسئول عن التخصص فى تفاعل الأجسام المضادة المتخصصة المتكونة عند حقن الأنتيجين الكامل فى داخل جسم الحيوان لا يستطيع تنبيه إنتاج الأجسام المضادة مثل هذا الجزء يسمى أنتيجين جزئى partial antigen أو هابتن hapten وهو غالبا ذو وزن جزيئى أقل من الأنتجين الكامل الذى اشتق منه. قد تحتوى الخلايا البكتيرية على مكون أنتيجين فى الجدار الخلوى وآخر فى جسم الخلية وثالث فى الأسواط ورابع فى الغلاف. تعتبر الأنتيجينات فى سطح خلايا بكتيريا *Salmonella* أنتجينات جسمية somatic يطلق عليها O antigens فى حين أنتيجينات الأسواط هى H antigens.

أهم ما يميز الأجسام المضادة أنها متخصصة فى تفاعلها مع الأنتيجينات أى أن

لها صفة التخصص specificity الشديدة. ومعنى ذلك أن الأجسام المضادة الخاصة بفيروس الجدرى لا تتفاعل مع الأنتيجينات البكتيرية ولا حتى مع الأنتيجينات الفيروسية الأخرى حيث لا تتفاعل مع فيروس الأنفلونزا أو فيروس موزايك الدخان ولكنها تتفاعل فقط مع فيروس الجدرى. يمكن أيضا للأجسام المضادة أن تتفاعل مع السلالات القريبة من الأنتجين الخاص به فإذا وجدت سلالات مشابهة لسلالات فيروس الجدرى فإنها تتفاعل معها ولكن بدرجة أقل. ولذلك يمكن أن تستخدم درجة التفاعل بين الأجسام المضادة والأنتيجين فى تقدير درجة القرابة بين سلالات الأنتيجين المختلفة ويمكن تقدير درجة القرابة فى حالة تفاعل الترسيب بكمية الراسب المتكون أو سرعة تكوينه فكلما زادت سرعة تكوين الراسب أو زادت كميته كلما كان ذلك دليل على شدة القرابة بين سلالة الأنتجين المختبرة والسلالة الأصلية والعكس صحيح فكلما قلت سرعة تكوين الراسب أو قلت كميته كان ذلك دليل على عدم تقارب السلالات وعدم تكوين راسب دليل على عدم وجود قرابة.

يسمى سيرم الدم blood serum المحتوى على أجسام مضادة باسم السيرم المضاد antiserum والأجسام المضادة تتكون أساسا من بروتين جاما جلوبيولين gamma globulin وقد توجد نسبة من بيتا جلوبيولين beta globulin ووزنها الجزيئى يكون حوالى ١٦٠,٠٠٠ دالتون. يمكن (شكل ٨٢) الحصول على السيرم المضاد وذلك بحقن الأنتجين فى أحد حيوانات التجارب مثل الفيران البيضاء فيران التجارب أو خنازير غينيا أو الأرانب. يتم الحقن فى حالة الفيران البيضاء وخنازير غينيا فى جزء معين فى بطن الحيوان أما فى حالة الأرنب يتم الحقن فى عروق الأذن حيث أن الأذن الكبيرة وعروقها واضحة مما يسهل حقنها لعدة مرات كما يسهل أخذ الدم منها. وبعد عدة أسابيع يتم سحب الدم من الحيوان المحقون ثم يترك الدم لفترة فى أنابيب اختبار أو ما يشابهها فيحدث ترسيب لكرات الدم الحمراء ويبقى على السطح سائل شفاف هو عبارة عن سيرم الدم serum والذى يحتوى على أجسام

مضادة ويسمى السيرم المضاد antiserum. فى بعض الحالات قد يحتاج الأمر إلى تعريض الدم المسحوب إلى قوة طرد مركزية لفصل السيرم عن كرات الدم الحمراء وحيث تستقر الأخيرة فى قاع الأنبوبة ويوجد السيرم فى الجزء العلوى من الأنبوبة وبذلك يسهل سحبه من الأنبوبة بواسطة ماصة أو ماصة دقيقة دون أن يختلط بكرات الدم الحمراء ويلاحظ أن استعمال قوة طرد مركزية يزيد من سرعة وكفاءة فصل السيرم عن كرات الدم الحمراء إلا أن لهذه الطريقة ضرر كبير أن قوة الطرد المركية قد تسبب تكسير لكرات الدم الحمراء وتختلط مكوناتها بسيرم الدم وتكون النتيجة عكسية. ولذلك يفضل عدم استعمال قوة طاردة مركزية إلا فى الحالات التى تستدعى ذلك. يسمى السيرم المضاد أيضا المصل المضاد.

هذه الاختبارت المستعملة على نطاق واسع فى علم أمراض الإنسان والحيوان قد طبقت أيضا لتعريف الكائنات المسببة للأمراض النباتية وخاصة الفيروس والبكتريا. ويجرى لذلك اختبارات عديدة منها ما يأتى للتعرف على نوع الفيرس أو الفيرويد أو الميكوبلازما أو البكتريا. الفكرة واحدة فى جميع هذه الأختبارات بالنسبة للإنسان والحيوان والنبات مع بعض التحويرات البسيطة للإنسان أو الحيوان أو النبات.

أ - المخلوط البسيط Simple mixture test:

يجرى هذا الاختبار فى أنابيب صغيرة حيث يوضع ١/٢- ١ سم^{3} من التحضير الفيروسى ثم يضاف اليها نفس الحجم من المصل المضاد ويخلطان جيدا وتترك الأنابيب فى حمام مائى على درجة ٣٧-٥٠°م حسب الفيروس المختبر. تكون راسب دليل على أن التفاعل ايجابى.

ب - اختيار الترسيب الحلقى Ring precipitation test:

يجرى هذا الاختبار فى أنابيب صغيرة ذات قطر ٢ - ٣ ملليمتر ويوضع بها المصل المضاد ثم يضاف للمصل المضاد نفس الحجم من التحضير الفيروسى بتخفيفات مختلفة وذلك بحذر شديد حتى لا يختلط التحضير الفيروسى بالمصل

المضاد. لو كان للأنتجين وزن نوعى أكبر من الوزن النوعى للمصل المضاد فيجب عمل العكس إذ يوضع أولا الأنتجين ثم يضاف اليه المصل المضاد. بالقرب من سطح تلامس المحلولين فإن الأجسام المضادة تنتشر خلال التحضير الفيروسى وكذلك فإن الجزئيات الفيروسية تنتشر أيضا خلال طبقة المصل المضاد فى مكان ما داخل حدود تلك المنطقة الضيقة. فإن نسب مكونات الخليط مبكرا أو مؤخرا سوف تكون ملائمة لتكوين راسب فى تلك الحالة على السطح الفاصل بين التحضير الفيروسى والمصل المضاد أو بالقرب منه تظهر حلقة أو قرص من الراسب. يجرى هذا التفاعل فى العادة تحت ظروف درجة حرارة الغرفة.

يمكن تقدير كمية الراسب المكون للحلقة كميا بإستخدام جهاز Libby photronreflectometer.

جـ- اختبار الترسيب الدقيقى Micropreciptation:

يستخدم فى هذا الاختبار أطباق بترى جافة يغطى قاعها بمادة غير محبة للماء وهى غالبا تكون مركب أو مادة formvar وذلك عن طريق وضع كمية منها فى قاع الطبق ثم تفرغ تاركة طبقة رقيقة تترك لتجف عدة ساعات فتكون غشاء فى قاع الطبق. توضع أطباق بترى على ورقة مربعات ٨ × ٨ سم ثم توضع نقطة من المصل المضاد فى كل مربع من المربعات ويضاف إليها نقط مماثلة من التحضير الفيروسى. طبقة الفورمفار تعمل على منع انتشار النقطة الموجودة بمربع إلى مربع آخر. بعد وضع نقط من التحضير الفيروسى على نقط المصل وخلطهم يصب زيت البرافين فى الطبق بحيث يغطى جميع النقط. يلاحظ تكوين الراسب الممكن مشاهدته بواسطة عدسة يدوية أو تحت القوة الصغرى للمجهر الضوئى.

د- تفاعل الترسيب فى الآجار= إختبار أوكترلونى
Immunodiffusion= ouchterlony test:

توجد عدة طرق للإنتشار أو الترسيب فى الآجار نذكر منها الإنتشار الثنائى

بطريقة أوكترلونى agar double diffusion test. يصب الآجار فى أطباق بترى بسمك ٢-٣ سم وبعد أن يتجمد. يتم فيه عمل ثقوب بواسطة ثاقبات خاصة مثل ثاقب الفلين cork- borer ويستعمل مقاس ٢ size 2 عادة - يحدد عددها حسب الإختبارات المطلوبة.

يوضع فى الثقوب الوسطية المصل المضاد للفيرس أما فى الثقوب المحيطة فيوضع التحضير الفيروسى، ينتشر الفيروس والأجسام المضادة خلال طبقة الآجار فى اتجاهين متضادين، فى منطقة التقابل والتى تكون فيها نسبة كل منهما إلى الآخر ملائمة يتكون شريط من الراسب. إذا كانت أحد التحضيّرات المستخدمة لاتحتوى على الفيروس أو تحتوى على فيروس مختلف عن الفيروس الذى حضر له المصل المضاد فإن شريط الراسب فى المنطقة الفاصلة والمقابلة لذلك الثقب الذى لايحتوى على الفيروس أو تحتوى على الفيروس المختلف لن يظهر. اذا احتوت التحضيرات على أنتجين واحد فإن أشرطة الترسيب تتحد مكونة كونتور متصل. وإذا كانت أنتجينات مختلفة فإن خطوط الترسيب تكون متقاطعة وإذا كانت أنتجينات متقاربة جزئيا فإن أحد خطى الترسيب يكون متقاطع. يستخدم هذا الإختبار فى الطب كثيرا.

هـ- اختبار ELISA:

يستخدم فى هذه الطريقة microtiter plates أطباق بلاستيك بها عديد من الانخفاضات (تجاويف أو آبار) wells. وهذه الآبار صغيرة الحجم جدا.

يتم تغطية coating سطح الآبار بالجسم المضاد وهو عبارة عن gamma globulin متخصص لفيرس معين ثم يغسل السطح بالماء حيث أن الغسيل بالماء يسبب ازالة الزائد الغير مدمص من الأجسام المضادة. يوجد لكل فيرس خاص جسم مضاد خاص. يضاف الفيرس المراد إختباره على المسطح ثم الغسيل بالماء وفى حالة وجود علاقة بين الفيرس والجسم المضاد سيلتصق الفيرس بالسطح وإذا لم

توجد علاقة سيتم غسيل الفيرس من على السطح تماما بالماء ثم يضاف إنزيمات مرتبطة بالجسم المضاد enzyme- linked antibody إلى السطح وهذه سترتبط بالفيرس على السطح ثم تزال الكمية الزائدة وذلك بالغسيل بالماء. اضافة مواد أو مادة التفاعل للأنزيم substrate على السطح. يقوم الإنزيم بتحليل مادة التفاعل وينتج عن ذلك لون أصفر. تعتبر درجة التركيز وشدة اللون الأصفر دليل على تركيز الفيرس فى العينة sample المختبرة. تستخدم هذه الطريقة فى التعرف على كثير أو جميع الأمراض الفيروسية والفيرويدية. يمكن أيضا أن تستخدم فى أمراض الميكوبلازما والسبيروبلازما.

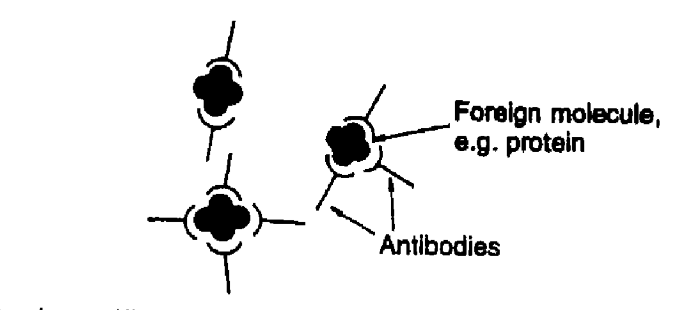
و- اختبار اللاتكس Latex test:

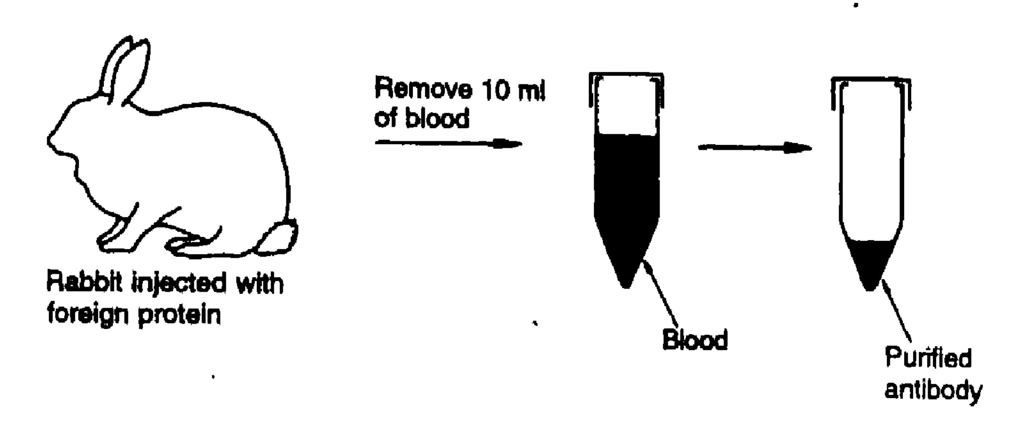
خاص بالنبات وتستخلص عصارة الجزء النباتى مثل الأوراق. يمكن عمل ذلك بواسطة مستخلص عصارة أتوماتيكى automatic extractor. يوضع العصير فى أنبوبة إختبار وبواسطة حقنه يأخذ العصير من الأنبوبة. يستعمل طبق بترى بلاستيك تخطط قاعدته إلى مربعات. وينقط فى طبق بترى نقطة فى كل مربع ثم تغسل الحقنة ليتم إستعمالها لعينة أخرى من عصير مصاب وهكذا لابد من غسيل الحقنة بين كل عينة مصابة. يجرى تخفيف العينة بمحلول منظم trisbuffer حيث أن العينة المركزة يكون تفاعلها غير واضح. تستخدم حقنة أخرى لوضع نقطة من محلول اللاتكس على كل نقطة عصير. يتكون اللاتكس من كرات polystyrene قطرها ١٠^٨ نانومتر. وفى بداية التحضير يتم خلط اللاتكس بالأجسام المضادة لفيرس معين.

ولذلك فإن اللاتكس المضاف يوجد على سطح حبيباته الأجسام المضادة. يتم تغطية الطبق بغطاءه ويوضع على هزاز لمدة ساعة ذو ١٣٠ لفة فى الدقيقة وهذه الخطوة هامة لاظهار التفاعل الموجب. إذا أن إستعمال هزاز دائرى ضرورى لاظهار التفاعل الموجب. فى حالة التفاعل "الإيجابى يوجد تجمعات لجزئيات اللاتكس يمكن رؤيتها بالعين المجردة وفى حالة التفاعل السالب يكون المخلوط متجانس لبنى اللون

والقوام. يمكن إستعمال هذا الختبار بنجاح للفيروسات والفيرويدات. إستعملت فى الكشف عن موزايك فول الصويا والموزايك المخطط فى الشعير.

فى حالة الإختبارات السيريولوجية وعند وجود الإمكانيات لتحضير أمصال مضادة للعديد من الفيروسات المختلفة فانه يمكن بالطرق السيريولوجية التعرف بسهولة وسرعة على الفيرس فى فترة وجيزة لاتتعدى الدقيقة وذلك فى حالة توفر الأمصال المضادة. بعكس الطرق البيولوجية التى تحتاج إلى وقت طويل ومجهود كبير وأدوات خاصة. ولهذا تنتشر طريقة التشخيص السيريولوجية انتشارا كبيرا كما يمكن بواسطتها الكشف عن الإصابات الكامنة المختلفة.



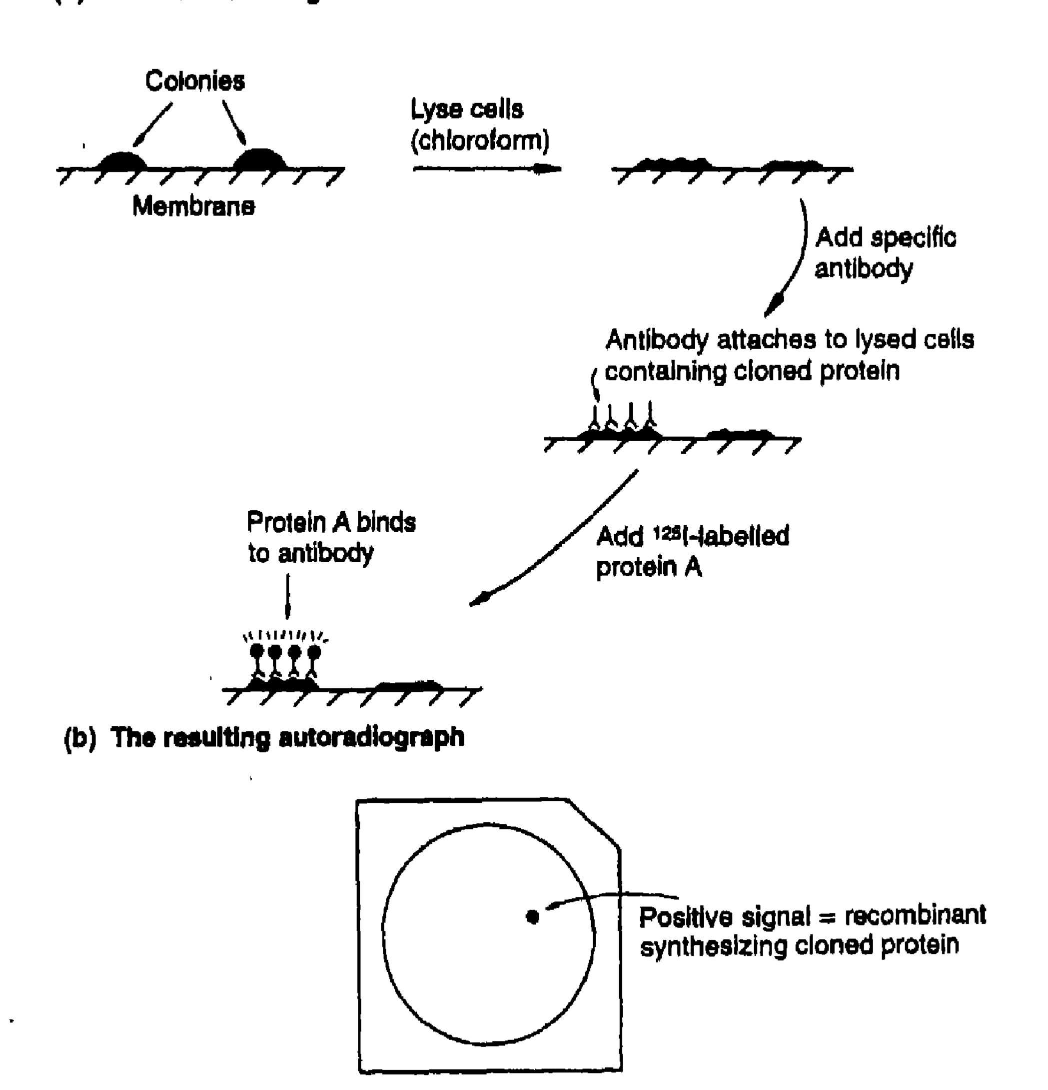


شكل ٨٢: الأجسام المضادة. (a) تحيط بالجزيئ الغريب، (b) حقن وتنقية الأجسام المضادة.

إستخدام أجسام مضادة نقية للتعرف على البروتين فى المستعمرات المعاد صياغتها - طرق سيريولوجية تناظر طريقة الجس الهجينى:

A serological test is a direct counterpart of colony hybridization probing.

وفى هذه الطريقة (شكل ٨٣) يتم نقل المستوطنات أو المستعمرات أو الكلونات المعاد صياغتها إلى غشاء بولى فينيل polyvinyl membrane ثم يتم عمل تحليل للخلايا ثم يضاف محلول محتوى على الأجسام المضادة المناسبة.

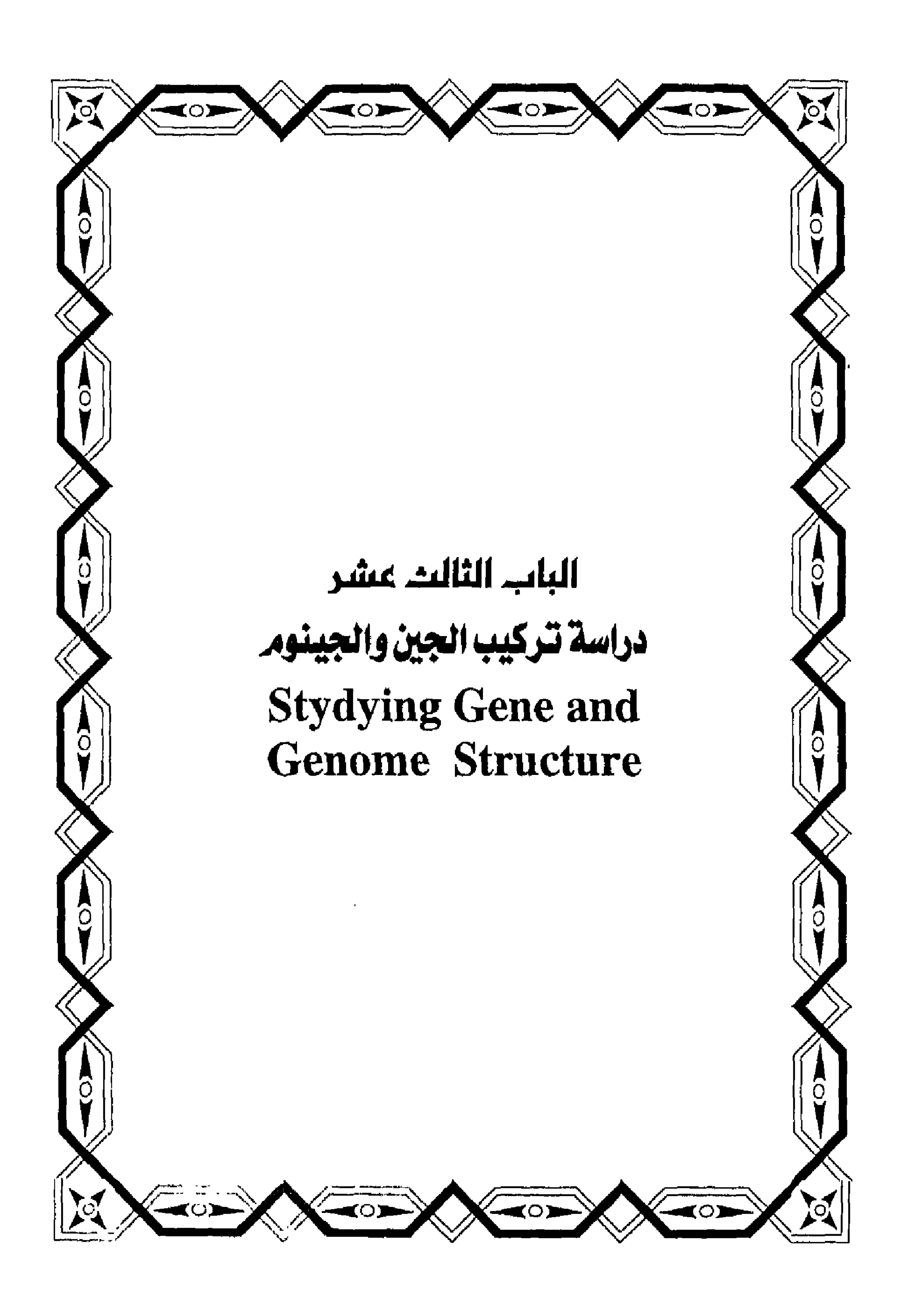


شكل ٨٣: إستخدام الأجسام المضادة النقية للكشف عن البروتين فى المستعمرات المعاد صياغتها. يمكن إستخدام بروتين A المعلم كما يمكن تعليم الجسم المضاد نفسه.

وقد تكون الأجسام المضادة ذاتها معلمة بالإشعاع أو يمكن أن تكون حالة أخـرى وهى فيها يتم غسل الغشاء بمحلول من بروتين A معلم labelled protein A، وهـذا البروتين A يكون عبارة عن بروتين بكتيرى والذى يرتبط فقط مع بروتين جلوبيولين الأجسام المضادة أى أنه متخصص تماما حيث أنه لايرتبط إلا مع الأجسام المضـادة. وبعد ذلك حيث أن بروتين A معلم مشع يتم تصويره بعد إرتباطه بالأجسام المضـادة والأخيرة مرتبطة بالبروتين المرغوب فى الخلية أى البروتين النـاتج عـن الجـين المطلوب. ثم يتم تصوير ذلك بالتصوير الإشعاعى الذاتى autoradiography فيظهـر مكان الأشعاع كنقطة سوداء غامقة. يمكن إستخدام معلم غير مشع ينتج عنه عمليـة فلوره أو إضاءة كيماوية أى بريق كيمـاوى chemiluminescence. توجـد طريقـة أخرى وهى أن جسم مضاد ثان second labelled antibody معلم يمكن أن يسـتخدم وحيث أنه يكون متخصص فى الإرتباط بالجسم المضاد رقم ١ أى الإبتدائى primary antibody.

تعتمد هذه الطريقة على أن الجين الموطن لابد أن يعبر عن نشاطه أى وظيفته أى يكون نشط غير خامل لكن ينتج بـروتين معـين يمكـن الكشـف عليـه بـالطرق السيريولوجية وأن يوجد هذا البروتين فى الخلايا المعاد صياغتها. ولكن لسوء الحظ يكون عادة الجين المنقول والموطن فى كائن آخر جديد يكون خامل فى الكائن الجديد بالرغم من أنه نشط فى الكائن الأول. ومن أمثلة ذلك عند توطين جين من الحيوان أو الإنسان أو النبات فى خلية بكتريا إ. كولاى عادة يكون الجين خامل غير نشـط فـى خلايا هذه البكتريا بالرغم من أنه نشط فى الكائن الأصلى ويشذ عن هـذه القاعـدة الجينات الخاصة بالبلاستيدات الخضراء عند نقلها للبكتريا إ. كولاى. يمكن تـلافى ذلك بإستخدام ناقل وسيط خاص يسمى ناقل وسيط معبر expression vector وهـو مصمم خصيصا لكن ينشط تعبير الجين الموطن لوظيفته أى يحول الجين الموطن من حالة الخمول إلى حالة النشاط فى الخلية البكتيرية. وقد تم إستخدام هـذه الطريقـة

بكثرة وهى المسح والإنتخاب السيريولوجى screening immunological لمستعمرات البكتريا إ. كولاى الحــاملة لجينات الحيــوان أى ذات الجينـــات الموطنـــة وذلــك بإستخدام الناقل الوسيط المعبر. وقد كانت هذه الطريقة مثالية وذات فائــدة كبيرة فى الحصول على جينات موطنة خاصة بإنتاج كثير مــن الهورمـــونات الهامــة مثــل الإنسولين (شكل ٦١).



الباب الثالث عشر

دراسة تركيب الجين والجينوم

Stydying Gene and Genome Structure

الباب الثالث عشر
دراسة تركيب الجين والجينوم
Studying Gene and Genome Structure

بعد نقل الجين المطلوب وتوطينه والحصول على الكلون الخاص بالجين الموطن ومن الأهمية بمكان بعد ذلك دراسة أهمية الجين وموقعه على الكروموسوم وأيضا دراسة علاقة تركيب الجين بالجينوم الموجود وتأثير الجين على التركيب الكلى والعام للجينوم أى للطاقم الوراثى.

تحديد مكان الجين الموطن
Detection Of Cloned Gene

توجد طرق عديدة تستعمل لتحديد موقع الجين الموطن على حزيئ دنا أى على الكروموسوم. يتوقف إختبار الطريقة على حجم جزيئ دنا حيث أن الطرق المستخدمة للجزيئات الصغيرة مثل البلازميدات وكروموسومات الفاج تختلف عن الطرق المستخدمة لتحديد موقع الجين على جزيئات دنا كبيرة الحجم فى كروموسومات الكائنات حقيقية النواة.

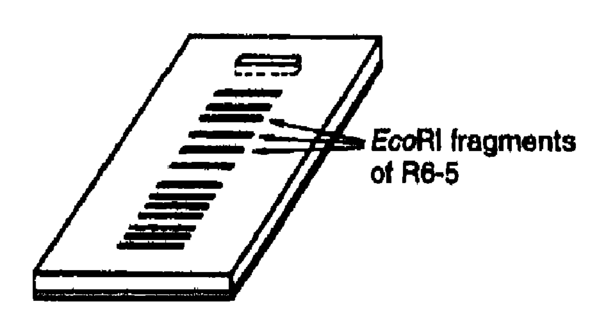
١ - تحديد موقع الجين الموطن على جزيئ دنا صغير:
Locating the position of a cloned gene on a small DNA molecule

سبق القول أنه عند نقل جين المقاومة للكانامیسین فإنه يتم تجزئى البلازميد R6-5 إلى ١٣ شظية مختلفة بواسطة Eco RI والمطلوب معرفة مكان وجود الجين على أى من هذه الشظايا. وهذه المعلومة تفيد فى وضع الجين على خريطة القطع restriction map للبلازميد R6-5 وتحدد موقعه بالنسبة للجينات الأخرى.

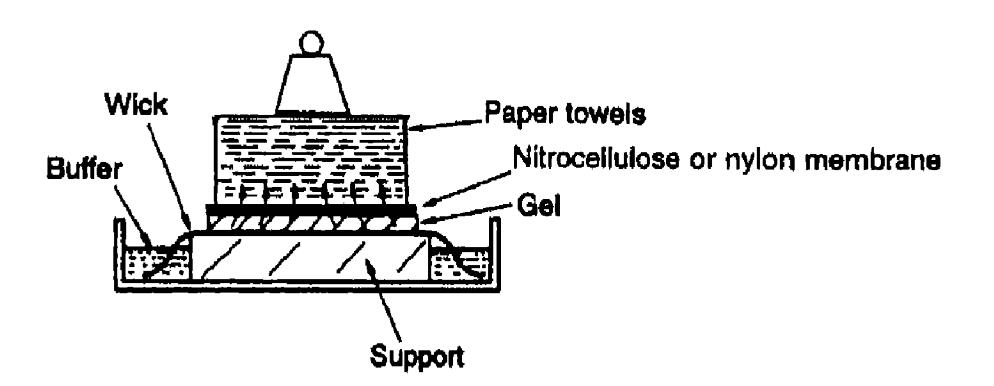
أولاً: ناتج قطع أى تجزيئ البلازميد R6-5 الحامل لجين المقاومة للكانامیسین يجب تجزيئه بواسطة إنزيم القطع *Eco*RI ويتم تجزيله إلى ١٣ جزء أى شظية. ثم يتم فصل هذه الشظايا بواسطة e. p. (electrophoresis) بأستعمال الأجاروز agarose (شكل ٨٤).

يمكن التعرف على الشظية الحاملة للجين المطلوب وذلك بإستعمال مجس معلم مشع أو غير مشع على الآجاروز. ولكن لا تكون النتائج جيدة حيث يحدث تداخل بين الآجاروز ومحتوياته مع المجس وعملية الجس أى التهجين ولذلك تكون النتائج غير واضحة تماما ولذلك فقد قام E. M. Southern بعمل طريقة سميت بأسمه عام ١٩٧٥ وهى نقل صزرن (شكل ٨٤) Southern transfer ومن مميزات هذه الطريقة أنه بعد التهجين بالمجس أى بالمنقب تصبح النتائج واضحة. وفى هذه الطريقة يتم نقل شظايا دنا إلى غشاء نيتروسيليلوز أو غشاء نيلون ليصبح الوسط نظيف رائق غير مختلط بالأجاروز أو محتوياته وتصبح عملية الجس والتهجين أسهل وأوضح. حيث يتم وضع الغشاء السابق على الآجاروز بعد فصل الشظايا عن بعضها فى الآجاروز ثم يتم نقل شرائط bands الشظايا الثلاثة عشر فى هذا المثال إلى الغشاء السابق وذلك بواسطة إستعمال محلول منظم مناسب يسبب بلولة تامة ويسبب هجرة الشظايا من الآجاروز إلى الغشاء وحيث تلتصق بالغشاء بشدة. يمكن عمل هذه الخطوات الأخيرة بجهاز معين يمكن شراؤه ويمكن عملها بكفاءة عالية بإستعمال كمية كبيرة من ورق التواليت وثقل وفى الحالة الأخيرة تحتاج إلى كفاءة وخبرة الباحث وفى هذه الحالة لا نحتاج إلى الجهاز. بعد ذلك يتم إستعمال المجس المعلم المشع أو الغير مشع ويحدث التهجين ويصبح مكان الجين المطلوب معلم نتيجة لوجود المجس المعلم ويتم معرفة ذلك بواسطة التصوير الأشعاعى الذاتى بإستعمال ورق تصوير معين وأشعة X فتظهر فى الصورة بقعة غامقة أو سوداء أو شريط غامق أسود يدل على مكان الجين. وهكذا يمكن تحديد مكان الجين على خريطة القطع R6-5 (شكل ٨٤).

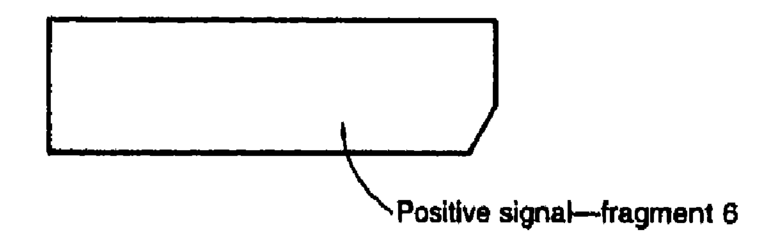
(a) Electrophorese *Eco*RI-restricted R6-5 DNA



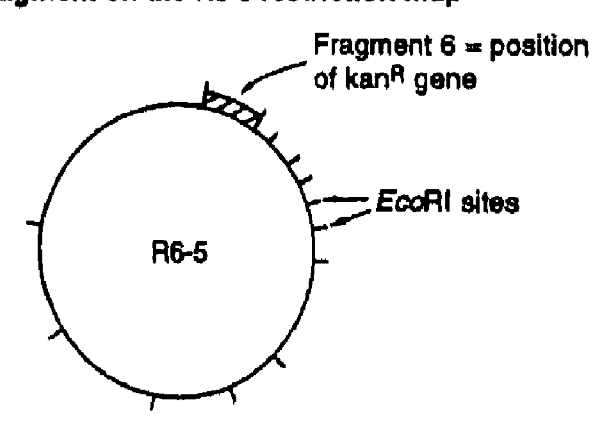
(b) Southern transfer



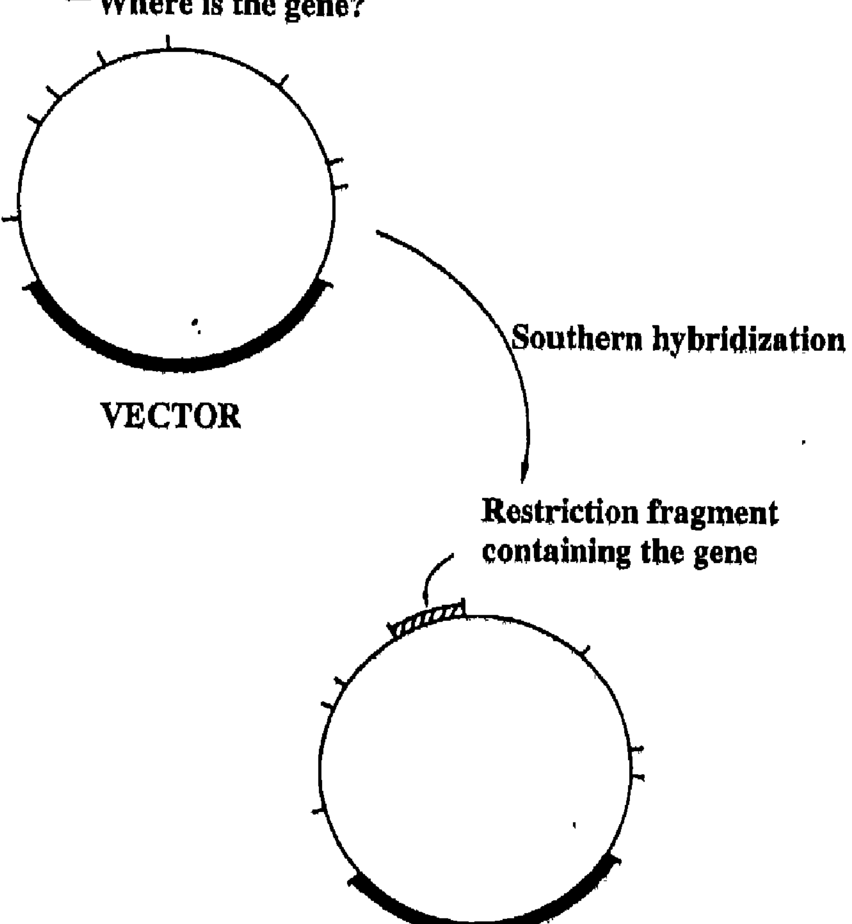
(c) Result of hybridization probing



(d) Locate the fragment on the R6-5 restriction map



شكل ٨٤: طريقة تهجين صزرن Southern hybridization.



شكل ٨٥: إستخدام طريقة هجين صزرن لتحديد موقع الجين الموطن فى جزيئ دنـا معاد صياغته.

يمكن عمل هذه الطريقة مع جزيئات رنا وتسمى northern transfer ويمكن عملها مع البروتين وتسمى western transfer. فى حالة نقل صزرن فإن فكرة الطريقة وأهميتها تتلخص فى الآتى:

Instead the DNA bands in the agarose gel are transferred to a nitrocellulose or nylon membrane, providing a much "cleaner" environment for the hybridization experiment

أى أن غشاء النيلون أو النيتروسيليلوز بيئة نقية ووسط نقى ذو كفاءة عالية فى إظهار الشرائط وحدوث عملية التهجين عند إستخدام المجس. نفس الشيئ ينطبق على الطريقتين الأخريتين northern transfer، western transfer.

وهكذا فإن هذه الطريقة ينتج عنها صنوان replica من شرائط DNA bands في جل الأجاروز. لو أنه تم إستخدام المجس في هذه الحالة فإن التهجين سيحدث ويتم إكتشافه بطريقة autoradiography (أو بطريقة أخرى متساوية في دقتها مع autoradiography مع إستخدام مجس غير مشع non- radioactive probe وسيوضح الشظية المقطوعة والتي تحتوي الجين الموطن (شكل ٨٤). وهكذا يمكن تحديد موقع جين المقاومة للكاناميسين على خريطة القطع للبلازميد R6-5.

R6-5 restriction map

يمكن تطبيق ذلك الإختبار وهذه الطريقة على تحديد موقع الجين الموطن في جزيئ دنا معاد صياغته. وهذا الإختبار مهم عندما تكون شظية دنا الموطنة كبيرة نسبيا (ممكن أن تكون ٤٠ كيلو قاعدة kb في حالة الناقل الوسيط الكوزميد) وحيث يكون الجين موضع الدراسة موجود في جزء ما من الشظية الموطنة ويكون أقل من ١ كيلو قاعدة في الحجم. يمكن أيضا للشظية الموطنة أن تحمل عدد من الجينات ومنها الجين تحت الدراسة. تم الحديث سابقا في هذا الكتاب عن كيفية تحديد مستوطنة clone من مكتبة الجينومات والتي يتبعها بعد ذلك طريقة صزرن لجزيئ دنا المعاد صياغته لتحديد الموقع السليم للجين تحت الدراسة في شظية دنا الموطنة (شكل ٨٥).

٢ - تحديد مكان الجين الموطن على جزيئ دنا كبير الحجم:

Locating the position of a cloned gene on a large DNA molecule.

طريقة صزرن مناسبة فقط إذا كان الجين المطلوب دراسته معروف له خرائط القطع لجزيئ دنا أو من السهل عملها restriction map for DNA molecule. من ذلك يتضح أن هذه الطريقة مناسبة لأغلب البلازميدات والفاجات والفيروسات وبالتالي تعتبر غير مناسبة ولا تستعمل لجزيئات دنا الكبيرة الحجم. خرائط القطع أي التحديد وتحديد جينات أو جين على خرائط القطع تكون عملية في غاية التعقيد عندما يكون حجم الجزيئات أكبر من ٢٥٠ كيلو قاعدة في الحجم (قارن ذلك بواسطة خريطة

القطع أو عمل خريطة القطع restriction mapping فى حالة الفاج لامدا والتى تم شرحها بالتفصيل فى باب سابق). تحديد الجين على خرائط التحديد أى القطع restriction mapping يكون سهل نسبيا فى حالة الفاج لامدا حيث أنه يعتبر صغير الحجم. تصور مثلا كيف سيكون التحليل معقد وشديد التعقيد فى حالة عندما يكون مواقع القطع والتحديد restriction sites هى خمسة أو عشرة أو يزيد.

لذلك توجد طرق أخرى لتحديد موقع الجين الموطن للكائنات الحية حقيقية النواة على جزيئات دنا المكونة للكروموسوم أى الصبغى. بالطبع لو أن هذا الجين أو الجينات محددة ومعروف موقعها بالطرق الوراثية التقليدية وبالتالى معروف موقعها على الخريطة الكروموسومية. ولكن فى كثير من الحالات، أن كثير من الجينات الموطنة غير محدد موقعها بالطرق الوراثية التقليدية على الخرائط الوراثية. كيف أن هذه الجينات يتم تحديد موقعها على الخرائط الوراثية؟.

للإجابة على هذا السؤال يجب أن نتبع عدة خطوات وهى بالتتابع ما يأتى:

أ - فصل الكروموسومات (الصبغيات) بواسطة .gel e. p.

ب - التهجين الموضعى للتحضير لتحديد موقع الجين الموطن على الكروموسوم حقيقى النواة.

جـ - السير على الكرموسوم من جين إلى آخر.

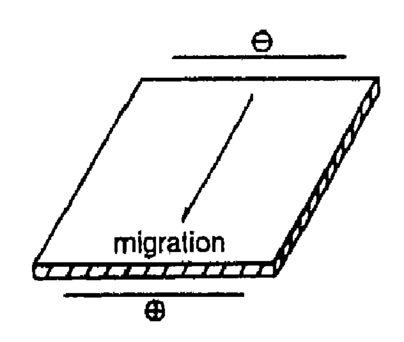
أ- فصل الكروموسومات بواسطة :gel. e. p.

Seperating chromosomes by gel electrophoresis:

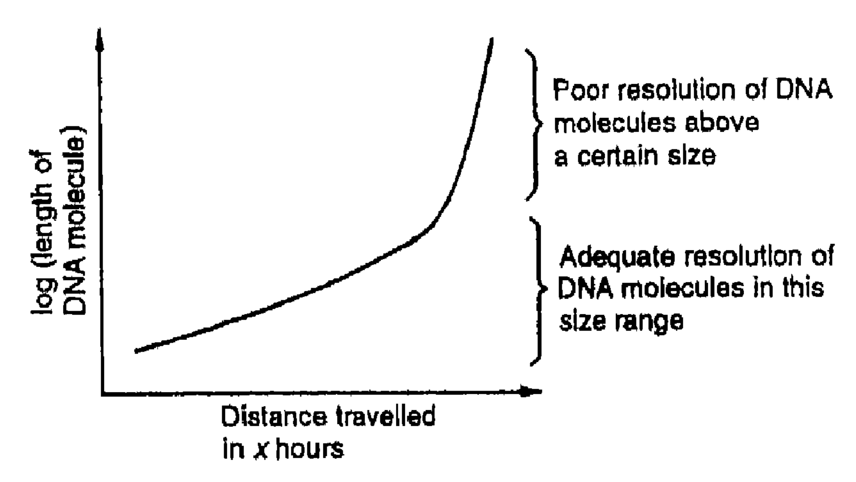
نحتاج إلى فصل الكروموسومات أولا أى بادئ ذى بدأ. ولذلك ما هو الكروموسوم (الصبغى) الذى يحمل الجين المطلوب - أى كروموسوم من مجموعة الكروموسومات هى الذى يحمل الجين المطلوب. للإجابة على ذلك فإنه فى بعض الكائنات الحية يمكن عمل ذلك بواسطة نوع من طريقة صزرن وحيث يحدث فيها تهجين ولكن لا نستعمل فيها شظايا قطع أى شظايا محددة ولكن نستخدم جزيئات دنا الكروموسوم أى الكروموسوم الذى يمكن فصله بطريقة محسنة متطورة من .gel e. p (gel electrophoresis).

فى طريقة .gel e. p العادية فإن الحقل الكهربائى يكون موجهة فى إتجاه طول الجل أى بالطول ونتيجة لذلك فإن جزيئات دنا تهاجر فى خط مستقيم فى إتجاه القطب الموجب (شكل ٨٦). يمكن فصل الأحجام المختلفة للجزيئات دنا بهذه الطريقة لأنها تهاجر بسرعات مختلفة فى الجل. ولكن يمكن فصل جزيئات دنا ذات أحجام معينة بهذه الطريقة ولكن فى حالة الجزيئات الكبيرة تقل سرعة الهجرة وكفاءة الفصل وهكذا تدريجيا حتى نصل إلى حجم معين تكون سرعة الهجرة والفصل غير محسوسة أو غير ممكنة نتيجة لكبر حجم الجزيئ. ويتحكم فى السرعة أيضا وكفاءة الفصل حجم الثقوب أى الفراغات الموجودة بين جزيئات الجل network of pores. عامة الجزيئات ذات حجم أكبر من ٥٠ كيلو قاعدة لا يمكن فصلها بدرجة مناسبة بواسطة طريقة .gel e. p المثالية.

(a) Conventional agarose gel electrophoresis

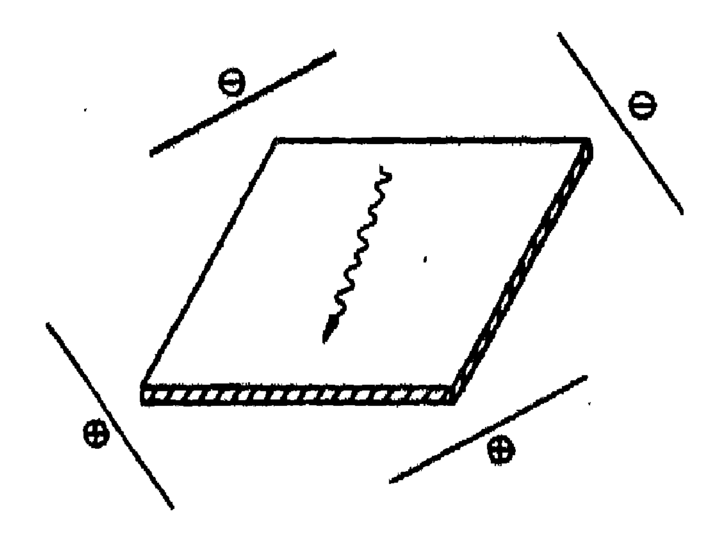


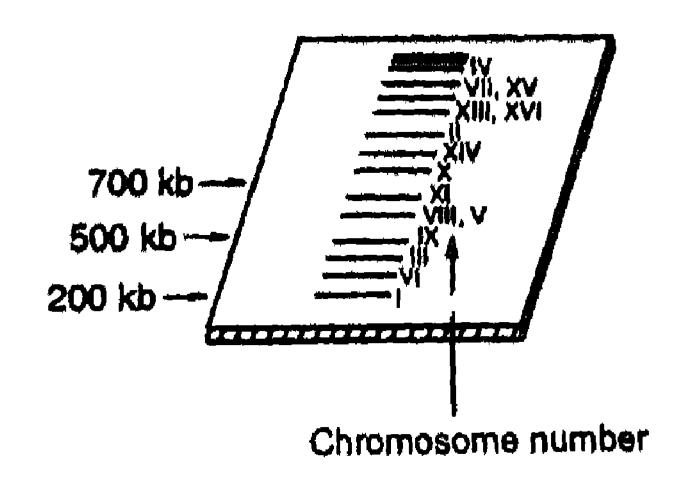
(b) The influence of DNA size on migration rate



شكل ٨٦: طريقة الهجرة فى وسط غروى (الأجاروز) ومجال كهربائى وحـــدودها. Conventional agarose gel electrophoresis and its limitations.

إنه يمكن تخطى هذه العقبة وذلك بإستخدام حقل كهربائى معقد مركب complex electric field. أمكن عمل أنظمة وطرق كثيرة لذلك ولكن أفضل هذه الطرق والأنظمة هو المسمى orthogonal field alternation gel electrophoresis وإختصاره OFAGE (شكل ٨٧).





شكل ٨٧: Orthogonal field alternation gel electrophoresis (OFAGE).

وفى هذه الحالة بدلا من إمرار تيار كهربائى بطول الجيل فإنه يتم حدوث تبادل للحقل الكهربائى أى بالتالى تبادل فى إتجاه سريان الحقل الكهربائى بين زوجين من الإلكترودات وكل زوج من الإلكترودات يمرر تيار كهربائى بزاوية ٤٥ درجة على طول الجل. نتيجة لذلك يتكون حقل نبضى pulsed field نتيجة لذلك فإن جزيئ دنا يغير من أتجاهه بإستمرار فى الحقل الكهربائى النابض تبعا للنبض. وحيث أن الإلكترودات تتبادل النبض فى الجل بطريقة منتظمة وسرعة منتظمة وفترة ثابتة موحده فإن جزيئات دنا فى الجل تغير من إتجاهها تبعا لذلك وتبعا لإتجاه النبض مرة فى إتجاه ومرة أخرى فى إتجاه آخر ولذلك تتحرك بسهولة أكثر قد يكون نتيجة لخلخلة وسط الإنتشار أى gel حولها أى أنها تؤثر على مسامية الوسط حولها أو تصبح أكثر كفاءة فى تخلل الوسط ولذلك تكون حركتها وهجرتها أسهل وتكون حصيلة الحركة أى حصيلة الهجرة لجزيئات دنا فى الجل تكون فى خط مستقيم من طرف إلى آخر (الآلية فى سرعة حركة الجزيئات هو نتيجة للتأثير على درجة المسامية حول الجزيئ بطريقة أو بأخرى قد تكون الآلية غير مدروسة تماما ولكن النتيجة النهائية سرعة الحركة للجزيئ). ولذلك فإن جزيئات دنا صغيرة الحجم تتجه إلى قاعدة الجل بسرعة أكبر من الجزيئات الكبيرة وهذه الطريقة تزيد من قدرة التمييز resolving power للجل بدرجة كبيرة. حيث أنه مع كل تغير فى إتجاه الحقل الكهربائى فإن كل جزيئ دنا يعيد من وضعه أى إتجاهه خلال زاوية ٩٠ درجة realign through 90 قبل إستكمال هجرته. وهذه هى حجر الزاوية حيث أن الجزيئات الصغيرة يمكن أن تغير من وضعها بسرعة أكبر من الجزيئات الكبيرة ولذلك تتجه الجزيئات الصغيرة فى إتجاه قاعدة الجل بسرعة أكبر. عامة فإن هذه الطريقة تزيد من قدرة التمييز resolving power للجل بدرجة كبيرة. ولذلك فإن جزيئات دنا حجمها حوالى عدة آلاف كيلو قاعدة يمكن فصلها بهذه الطريقة. هذا الحجم يتراوح بين الأحجام الآتية وهى كروموسومات (صبغيات) عديد من الكائنات حقيقية النواة مثل الخميرة وعديد من الفطريات الخيطية الهامة والبروتوزوا أى الحيوانات الأولية

مثل طفيل الملاريا وأسمه *plasmodium falciparum*. ولذلك فإنه بهذه الطريقة يمكن الحصول على جل محتوى على كروموسوم منفصلة (شكل ٨٧).

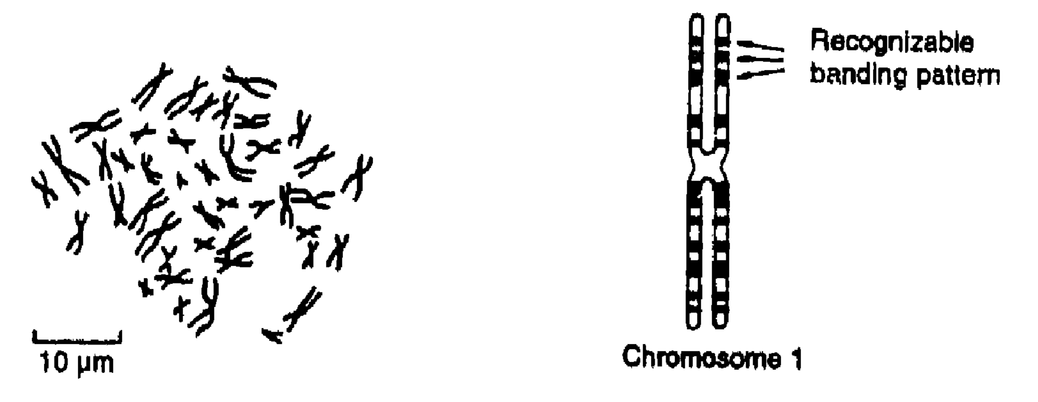
توجد طرق أخرى مشابهة للطريقة OFAGE مثل الطريقة CHEF وهى إختصار contour clamped homogeneous electric fields وأيضا طريقة field inversion gel electrophoresis FIGE وهى طرق مفيدة أيضا وهامة. وفى هذه الطرق توجد ميزة هامة وهى أن دنا الكروموسوم يتم تنقيته من الجل وبذلك يمكن عمل مكاتب جينية للكروموسومات وكل واحدة من هذه المكاتب تحمل الجينات الخاصة بكروموسوم واحد. وبذلك تكون هذه المكاتب تكون أصغر وأسهل فى التداول عن مكتبة الجينوم الكاملة. بالإضافة إلى ذلك جزيئات دنا للكروموسوم يمكن نقلها إلى غشاء نيلون أو نيتروسيلليلوز بواسطة طريقة صزرن ثم يتم عمل إختبار التهجين وبذلك يمكن التعرف على الصبغى الحامل للجين المطلوب.

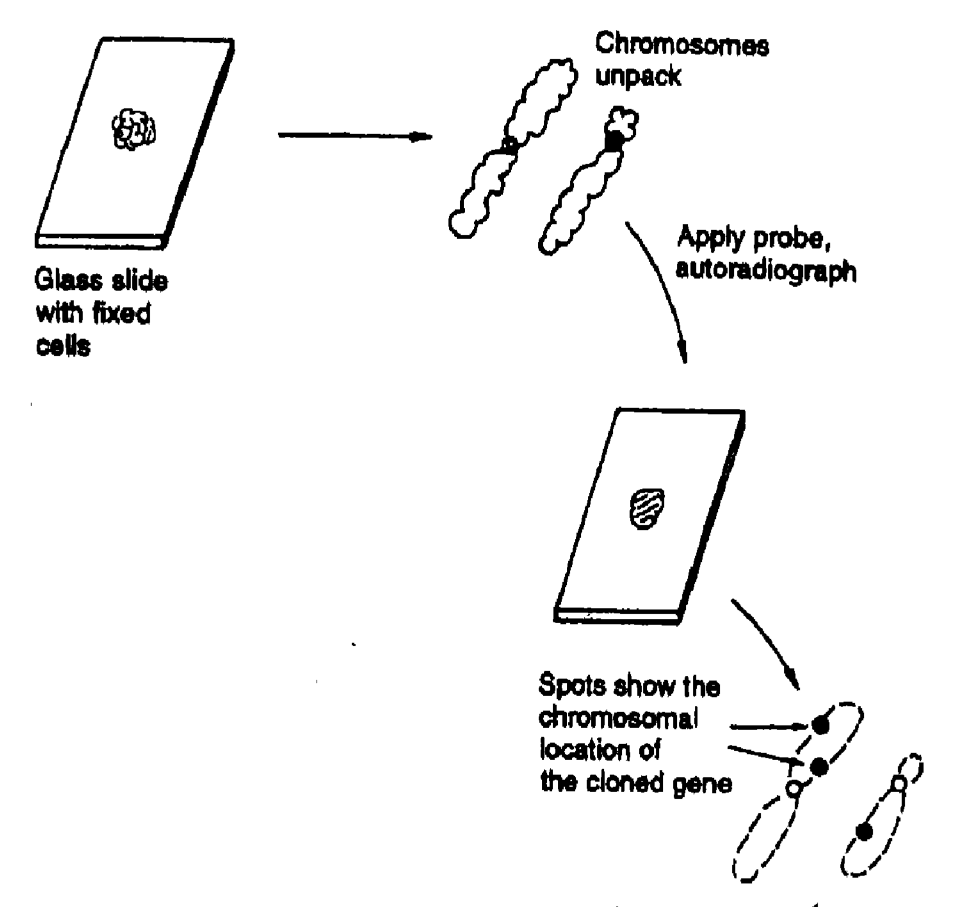
ب- التهجين الموضعى للتحضير (للكروموسوم) لتحديد مكان الجين الموطن:

***In situ* hybridization to visualize the position of a cloned gene on an eukaryotic chromosome:**

جميع الطرق السابقة وهى OFAGE و CHEF و FIGE محددة للكائنات الحقيقية النواة الدنيئة lower eukaryotes ذات الصبغيات والتى تكون صغيرة نسبيا. ولكن الصبغيات الكبيرة تكون أكبر من خمسون ألف كيلو قاعدة توجد فى الثدييات والكائنات الحقيقية النواة الراقية لازالت حتى الآن خارج نطاق هذه الطرق أى أنه لا توجد حتى الآن طرق يمكن بها التعامل مع الصبغيات الكبيرة الحجم. ولكن يمكن تحديد موقع الجين على هذه الجزيئات من دنا الكبيرة الحجم بواسطة طريقة التهجين الموضعى للتحضير (شكل ٨٨) in situ hybridization. حيث أنه يمكن بهذه الطريقة تحديد موقع الجين المطلوب على الكروموسوم. وفى هذه الطريقة يتم تحضير الخلايا وهى فى حالة إنقسام كما فى السيتولوجى وبوضع مثبت fixative على شريحة زجاجية ثم يتم تحضينها بواسطة وفى إنزيم ريبونيوكليز وإيدروكسيد الصوديوم

لتحليل رنا ودنترة دنا. أزدواج القواعد أى تزاوجها بين نيوكليوتيدات الحلزونين المترافقين يتم تكسيره ثم يتم فك الكروموسوم بدرجة مناسبة معرضا بذلك أجزاء من دنا للخارج والتى تكون دائما مختفية أى محجوبة فى الصبغى العادى.





شكل ٢٢٢ : خطوات عمل *In situ* hybridization.

ثم يتم معاملة الصبغى أى التحضير بواسطة مجس معلم ويحدث تهجين أى تزاوج بين الصبغى أى بين الجين المطلوب أى الموطن وبين المجس الخاص به ويتم التعرف على موقع الجين كبقعة سوداء على الكروموسوم بعد عملية التصوير الأشعاعى الذاتى. وقد أستعملت هذه الطريقة بإستعمال مجس معلم مشع للتعرف على مواقع عديد من الجينات فى خريطة الإنسان السيتو وراثية وذلك بالرغم من صعوبة هذه الطريقة in situ hybridization. يمكن بدلا من إستعمال معلم مشع أن يستعمل معلم غير مشع أى متفلور أى فلورى حيث يتم لصق المعلم الفلورى بالمجس ثم يتم عمل التهجين بالمجس الفلورى يمكن رؤية ذلك بنوع خاص من المجهر الضوئى العادى. يمكن إستخدام هذه الطريقة للكشف عن عديد من الجينات فى آن واحد وذلك بإستعمال عديد من المركبات المفلورة ذات الألوان المختلفة حيث أن كل جين مع مجس فلورى ذو لون معين يمكن تمييزهم بواسطة الألوان المختلفة. هذه الطريقة تسمى FISH وهى إختصار fluorescence in situ hybridization تستخدم أيضا بكثرة مع وجود مجسات معروف أماكن التهجين الخاصة بها على الصبغى ولذلك فإنها تستخدم بكثرة فى حالة التغييرات التركيبية للكروموسومات مثل التضاعف duplication والأنتقال translocation والنقص deletion والإنقلاب inversion يمكن التعرف على جميع هذه الحالات بسرعة كبيرة بواسطة FISH عنه بإستعمال طرق الصبغ العادية التقليدية.

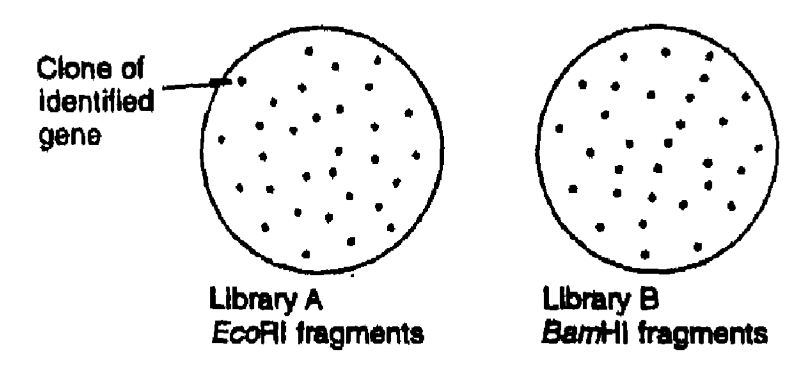
جـ - السير على الكروموسوم من جين إلى آخر:

Walking along a chromosome from one gene to another:

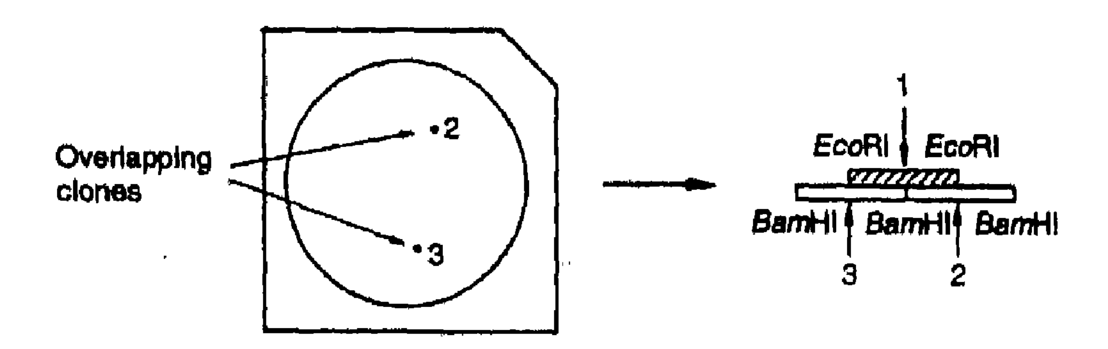
فى الطرق السابقة يتم التعرف على جين معروف تركيبه سابقا وذلك بعمل المجس المناسب. ولكن فى أحيان أخرى يكون معروف مكان الجين ولكن لا يتوفر المجس لهذا الجين ولذلك فإن الكلون المناسب لا يمكن عزله من مكتبة الجينوم. ولذلك توجد طريقة أخرى مناسبة للتعرف على الكلون تسمى السير على الصبغى أى الكروموسوم

chromosome walking (شكل ٨٩) ولابد أن يتوفر لهذه الطريقة وجود جين آخر معروف مقارب للجين المطلوب دراسته.

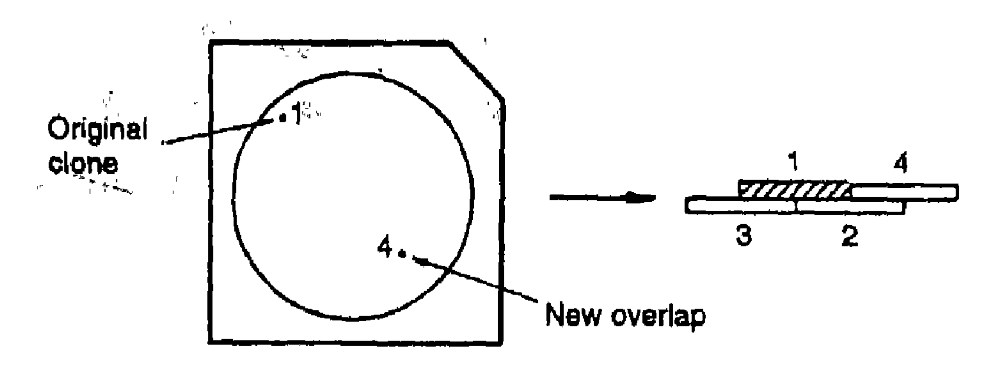
(a) Two clone libraries



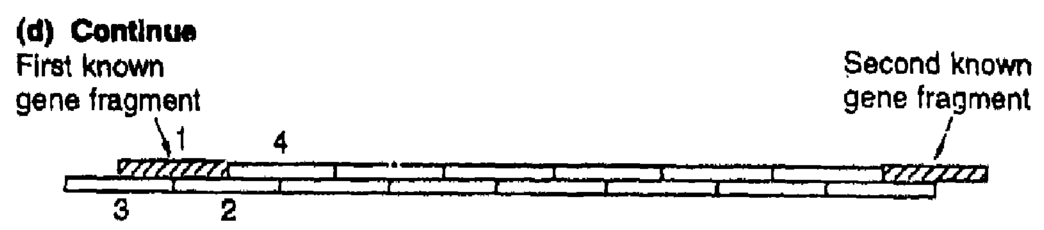
(b) Probe B with clone 1



(c) Probe A with clone 2



(d) Continue



شكل ٨٩: طريقة السير على الكروموسوم chromosome walking

نحتاج إلى مكتبتين كلون كل واحدة يتم تجهيزها بإنزيم قطع داخلى restriction endonuclease خاص ومثال ذلك إنزيم *Eco* RI لأحدهما وأنزيم قطع *Bam* HI للآخر. الشظيتين المحمولتين بكلونين مختلفين فى المكتبتين يحدث لهما تداخل overlapping.

بداية السير على الكروموسوم فإن الكلون الحاوى للجين المعروف تماما يأخذ من المكتبة A ويستعمل الجس المكتبة B. واحد أو أكثر من الكلونات من المكتبة B يعطى علامة تهجين موجبة أى يكون التهجين موجب أى يوجد تهجين يوضح ذلك أن الشظايا المحمولة بهذه الكلونات تتداخل over lap مع الشظية المحمولة عن طريق المجس. ولذلك فإن أحد هذه الكلونات من المكتبة B يستخدم لجس المكتبة A. الكلون الأصلى ويمكن أيضا بعض الكلونات الأخرى أن يحدث لها تهجين. يتم تكرار هذه الدورة لمرات عديدة وبذلك يتم عمل وبناء خريطة تدريجيا وتتزايد فى الحجم تدريجيا وحتى يتم عمل خريطة محددة (خريطة قطع) جزئية a partial restriction map حتى نصل للجين المطلوب دراسته.

الحقيقة أن طريقة السير على الصبغى أكبر إنجاز تم بهذه الطريقة كان طول حوالى ٢٠٠ إلى ٢٥٠ كيلو قاعدة. وعلى أى حال فإن هذه الطريقة أدت إلى نجاح باهر خاصة فى تحديد مواقع الجينات المسئولة عن أمراض الإنسان مثل cystic fibrosis ولذلك فإنه من المتوقع إدخال بعض التحسينات على هذه الطريقة فى المستقبل لتصبح أكثر إستعمالا وشمولا.

تتابع القواعد فى دنا أو الجين أو خارج تركيب الجين
DNA Sequencing

تتابع القواعد فى دنا أو الجين يعتبر من أهم الطرق المطلوبة فى دراسة البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية. أمكن التعرف على كيفية عمل تتابع القواعد حوالى ١٩٦٥-١٩٦٧ ولكن أصبحت الطرق هائلة وفعالة ودقيقة فى أواخر السبعينات. يمكن عمل ذلك بطريقتين مختلفتين وهى طريقة بناء دنا والمعروفة بإسم طريقة إنتهاء السلسلة chain termination method والتى تم إختراعها بواسطة الأنجليزيان سانجر وكولسون Coulson و Sanger أو بطريقة التحلل الكيماوى chemical degradation بواسطة الأمريكيان ماكسام وجلبرت Gilbert و Maxam. الطريقتان مختلفتان وعكسيتان ولكن كل منهما فعال وهام. حيث أن كلتيهما تسمح بالتعرف على تتابع القواعد فى دنا لعديد من كيلو قاعدة فى الطول فى زمن قصير نسبيا. ويعتبر التعرف على تتابع القواعد فى دنا أكثر الطرق أساسية أى أنها الأكثر أساسية most basic type للحصول على معلومات خاصة بتوطين الجين.

١- طريقة بناء دنا - طريقة خاتمة السلسلة - سانجروكولسون:
Sanger- Coulson method- chain terminating nucleotides

تحتاج هذه الطريقة إلى خيط دنا مفرد وأيضا توطين هذا الخيط طبيعيا فى الناقل الوسيط عادة M13. حيث أن بناء دنا يكون للشريط أى الحلزون التكميلى لخيط الأول المفرد والذى يعتبر أصل template (شكل ٩٠).

(a) Anneal the primer



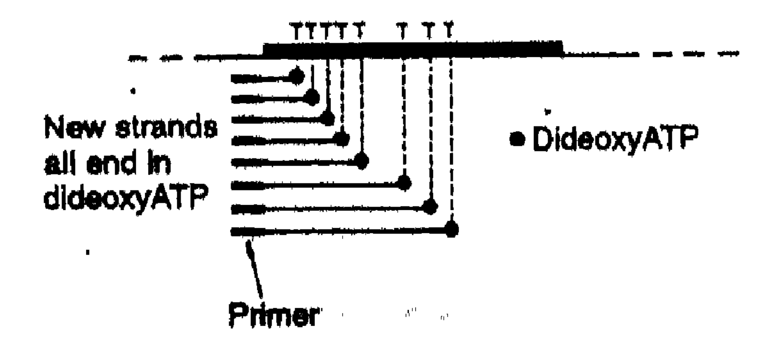
Primer

DNA polymerase
dATP dTTP
dGTP dCTP
dideoxyATP

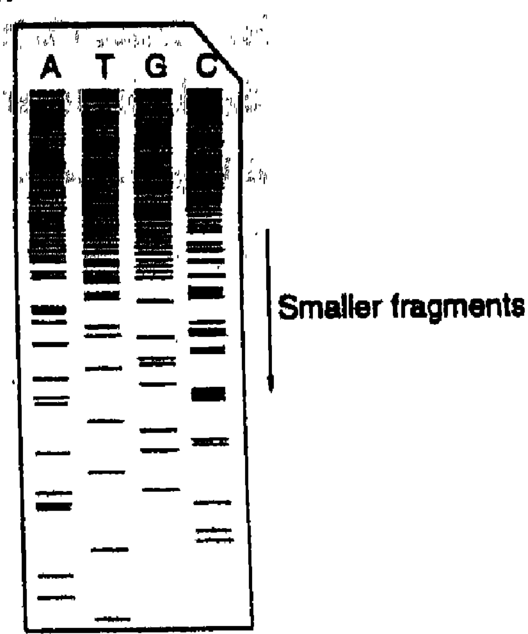
(b) DideoxyATP

*Position where the -OH of a dNTP is replaced by -H

(c) Strand synthesis



(d) Resulting autoradiograph



شكل ٩٠ : خطوات Chain termination DNA sequencing

أ – البادئ the primer: أول خطوة هذه الطريقة خاتمة السلسلة هو ربط جزيئ قصير من قليل النيوكليوتيدات قبل بداية جزيئ دنا الموطن على دنا الناقل الوسيط ويكون ذلك بإزدواج البادئ معه أى حدوث عملية annealing بين البادئ وبين قبل بداية جزيئ دنا الموطن مباشرة M13. سيعمل البادئ كنقطة بداية للشريط التكميلى أى الحلزون المكمل ويتم بناء هذا الحلزون بواسطة شظية كليناو لإنزيم بلمرة دنا رقم I– Klenow fragment of DNA polymerase I– أو إنزيم مشابه مثل sequenase وهو عبارة عن إنزيم محور لإنزيم بلمرة دنا يشفر وينتج بواسطة الفاج T7. يجب التذكرة بأن هذه الإنزيمات تحتاج إلى منطقة ثنائية الشريط أى ثنائية الحلزون والتى منها تبدأ عملية التخليق. يتراوح البادئ anneals مع الناقل الوسيط فى مكان ملاصق لعديد الوصل the polylinker.

ب – تخليق حلزون تكميلى Synthesis of the complementary strand:
يبدأ التخليق بإضافة الإنزيم وهو إنزيم بلمرة دنا مع واحدة من كل من dATP و dTTP و dGTP و dCTP. ولذلك ينتج أربعة أنواع من الحلزون أو الخيط (شكل ٢٤٤d) وبالإضافة إلى ذلك فإن نيوكليوتيدة محورة يتم وضعها فى مخلوط التفاعل وهى dideoxy ATP أى dideoxy nucleotide والتى يمكن ربطها مع فى سلسلة عديد النيوكليوتيدات النامية – أى التى يتم بناؤها تدريجيا – وهذه النيوكليوتيدة الأخيرة ترتبط بالسلسلة طبيعيا كما فى النيوكليوتيدات الأخرى ولكنها تكون خاتمة السلسلة لأنها ينقصها مجموعة الإيدروكسيد فى الموقع رقم ٣' فى جزيئ السكر. حيث أن هذه المجموعة من الإيدروكسيد لابد من تواجدها لكى يحدث ربط للنيوكليوتيدة التالية. تحدث خاتمة السلسلة عندما توجد هذه النيوكليوتيدة ملتحمة بالإنزيم. ويوجد حلزون أو شريط ينتهى بـ ddTTP وحلزون أو شريط ثالث ينتهى بـ ddGTP وهكذا وتكون أطوالهم مختلفة.

ولذلك عند إضافة دى دى أوكسى dideoxynucleotide ATP-ATP– ثم تحدث

الخاتمة فى أماكن مواجهة أى مقابلة للثيميدينات thymidines فى الأصل template أى الحلزون الأصلى. ولكن لا تحدث الخاتمة بإستمرار عند أول ثيمين وحيث يوجد بإستمرار dATP طبيعى والذى يمكن أن يرتبط بدلا من دى دى أوكسى ATP. نسبة dATP إلى دى دى أوكسى ATP تؤثر على طول حلزون دنا التكميلى حيث أنه كلما زادت نسبة المركب الأول كان إحتمال وجود عدد أكبر من السلاسل الطويلة قبل حدوث الخاتمة. ونتيجة ذلك أن عدد كبير من - أى عائلة من - حلزونات مكملة جديدة تتكون وذات أطوال مختلفة ولكنها تنتهى دائما بدى دى أوكسى ATP. نفس الشيئ بالنسبة للحلزونات الأخرى التى تنتهى بـ ddT أو ddG أو ddC.

جـ- حدوث أربعة تفاعلات مختلفة لتكوين أربعة عائلات من حلزونات مكملة مختومة:

Four seperate reactions result in four families of terminated strands

تحدث تفاعلات لتخليق الحلزون المكمل متوازية أربعة مرات. حيث يوجد تفاعل مع دى دى أوكسى the strand synthesis reaction is carried out ATP four .times in parallel.

وتفاعل آخر مع دى دى أوكسى TTP وتفاعل مع دى دى أوكسى GTP وتفاعل مع دى دى أوكسى CTP. نتيجة لذلك يتكون أربعة عائلات مختلفة مميزة من عديد النيوكليوتيدات المكمل المخلق حديثا. حيث أن عائلة تحتوى حلزونات عديدة تنتهى بدى دى أوكسى ATP وعائلة أخرى تحتوى حلزونات عديدة تنتهى بدى دى أوكسى TTP وهكذا يجب أن تكون هذه التفاعلات الأربعة متماثلة تماما ماعدا الخاتمة.

يلى ذلك عزل مكونات حلزونات كل عائلة وهى تكون مختلفة الأطوال فى كل عائلة. ولكى يمكن تحديد الأطوال. يكون ذلك بإستخدام فصل الهجرة الكهربائية gel .e. p. يجب توخى الحذر والدقة فى هذه الطريقة حيث لابد من فصل وفرز أطوال الحلزونات التى تختلف فى طولها فى نيوكلوتيدة واحدة. ولذلك تجرى عملية فصل e.

p. الهجرة الكهربائية فى طبقة رفيعة جدا من بولى أكريل أميد polyacrylamide أقل من ٥ مم فى السمك. يحتوى غروى البولى أكريل أميد على يوريا والتى تسبب دنترة دنا ولذلك فإن الحلزونات المخلقة حديثا أى المكملة تنفصل عن الحلزون الأصلى template. بالإضافة لذلك فإن فصل الهجرة الكهربائى يتم عمله فى فولت عال بحيث أن الجل gel يصبح ساخن حتى درجة ٦٠ مئوية أو أعلى وبذلك يمكن التأكد من أى الحلزونين الأشقاء لن يحدث لهم تجمع مرة أخرى.

ولذلك كل حزمة band فى الجل تحتوى على كمية ضئيلة جدا من دنا ولذلك يستعمل التصوير الأشعاعى الذاتى لتوضيح النتائج (شكل ٩٠). يتم تعليم الحلزونات المكملة أى الجديدة وذلك بإستخدام دى أوكسى نيوكليوتيد معلم مشع يحتوى على فوسفور مشع أى فو ٣٢ أو كبريت مشع أى كب٣٥ ومثال ذلك 32P- dATP أو 35S- dATP وذلك بإضافة هذه المركبات إلى مخلوط التفاعل reaction mixture الــلازم لتخليق الحلزونات المكملة الجديدة مبكرا ولاــبد أن يكون فى المراحل الأولى.

د- قراءة تتابع قواعد دنا من صورة التصوير الأشعاعى الذاتى:

Reading the DNA sequence from the autoradiograph:

قراءة تتابع القواعد سهل جدا (شكل ٩١) من صورة التصوير الأشعاعى الذاتى. أول حزمة متحركة أى الأسرع يتم تحديد موقعها وهى تمثل أصغر جزء من دنا وحيث يكون الحلزون منتهى أى خاتمة الحلزون تكون بإضافة دى دى أوكسى نيوكليوتيد فى أول موقع على الأصل template. يتم تعيين الحارة أو الممر المحتوية على ذلك track وليكن A ولذلك يكون أول نيوكليوتيده فى التتابع تكون A. تكون الحزمة المتحركة الثانية ذات نيوكليوتيدة واحدة أطول من الأولى وتكون فى الحارة أو الممر T وتكون النيوكليوتيدة الثانية T وهكذا يكون التتابع AT. يتم عمل ذلك بالتتابع كما سبق عبر الصورة وهكذا autoradiograph حتى تصبح الحزم المنفردة

متجمعة بعضها وبدرجة لا يمكن فصلها عن بعضها. وهكذا يمكن قراءة تتابع حوالى ٤٠٠ نيوكليوتيدة من الصورة بهذه الطريقة.

شكل ٩١: ترجمة autoradiography النـاتج عـن تجربـة chain termination sequencing. كل حارة تحتوى على دنا خاص واحد من الأربعة dideoxy NTPs. يتم قراءة التتابع وذلك بالتتابع إلى أعلى مبتدئا بالنيوكليوتيدة الأبعد أى الأصغر أى ddA.

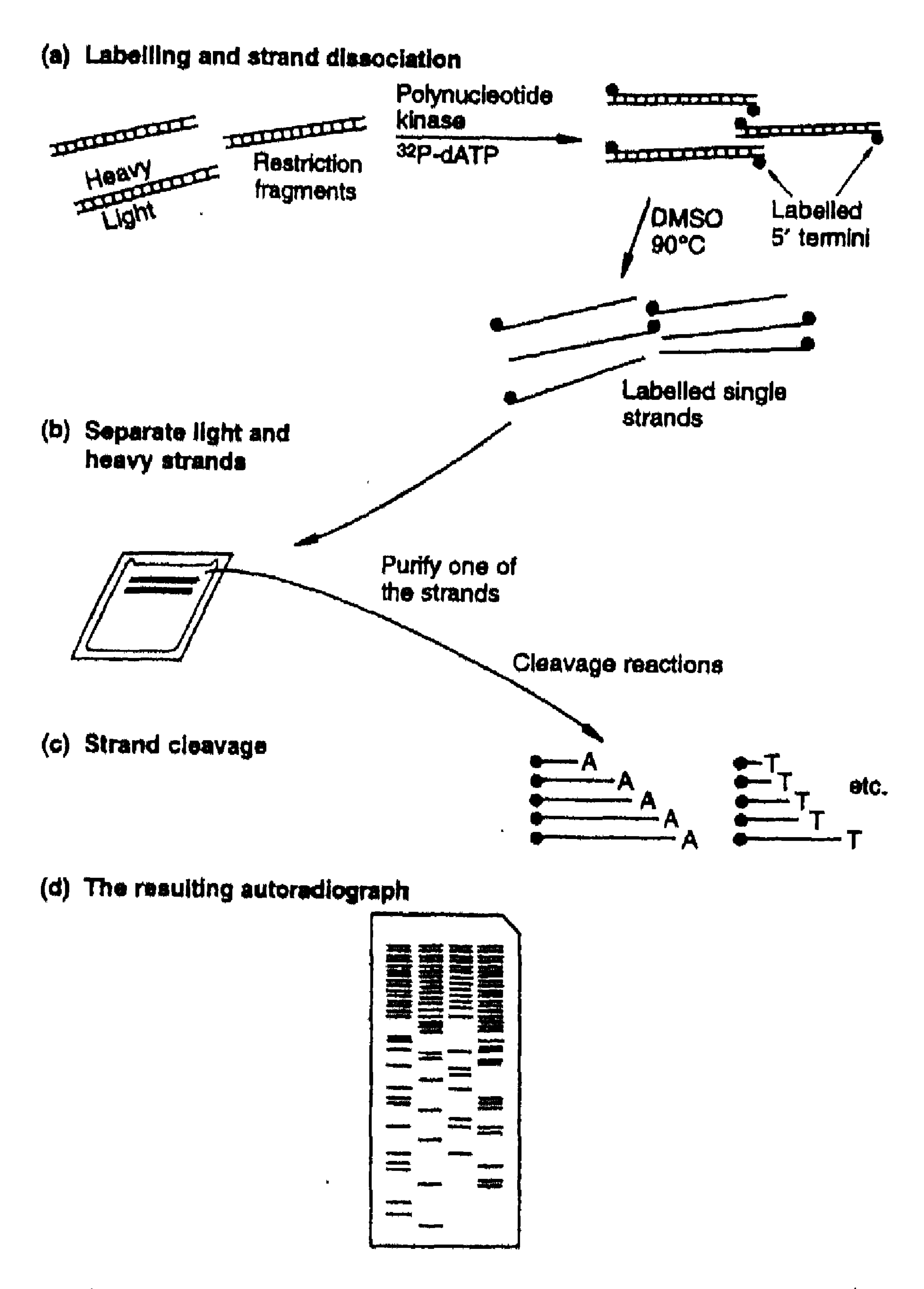
٢- طريقة التحلل الكيماوى- طريقة ماكسام وجلبرت:

The Maxam- Gilbert method- Chemical degradation of DNA

تختلف هذه الطريقة عن السابقة فى أنها هدم لدنا وليست بناء ولذلك تحتاج أولا

إلى شظايا من جزيئ دنا ثنائى الحلزون ds DNA وهى بذلك تختلف عن الطريقة السابقة وأيضا أنها لا تحتاج إلى ناقل وسيط.

وكذلك تختلف عن الطريقة السابقة فى أنها لا تحتاج بادئ primer. تستخدم عديد من الكيماويات تسمى بالدلائل reagents لقطع جزيئ دنا فى أنبوبة الإختبار فى المعمل ويجب الحذر فى إستعمالها (شكل ٩٢) لأنها تؤثر بنفس الطريقة على الإنسان والحيوان والنبات وتكون أغلبها سامة جدا. تعامل شظية دنا ثنائية الحلزون المطلوب معرفة تتابع القواعد فيها وذلك بحيث تعلم بمعلم مشع وذلك بربط فوسفور مشع إلى النهاية Q^1 لكل حلزون من الشظية ثنائية الحلزون. يضاف بعد ذلك مركب dimethyl sulphoxide ثم يتم تدفئة دنا المشع حتى درجة ٩٠ مئوية وينتج عن ذلك فك إزدواج القواعد وحل وفك حلزونى جزيئ دنا عن بعضهما. ثم يتم فصل حلزونى دنا عن بعضهما بواسطة فصل الهجرة الكهربائية ويعتمد هذا الفصل على أن أحد الحلزونين يكون أثقل نسبيا من الآخر لأنه يعتمد على كمية أكبر من البيورينات وتبعا لذلك يحتوى الحلزون الآخر على كمية أكبر من البيريميدينات. ينقى حلزون واحد من الجل ويتم عمل أربعة عينات منه منفصلة. وكل عينة منها ويتم تجزئيها بواسطة واحد من الدلائل التى تسبب عملية القطع للجزيئ cleavage reagents. فى الحقيقة إن أول مجموعة من الدلائل والتى يجب إضافتها تسبب تحوير كيماوى متخصص فى النيوكليوتيدات وبذلك تجعل الحلزون قابل للإنشقاق عند نيوكليوتيدة معينة عند إضافة مركب بيبيريدين piperidine. وهكذا فإن عملية التحوير والإنشقاق يتم ضبطهما وذلك بعمل ظروف معينة والتى ينتج عنها قطع واحد فقط لكل حلزون. بعض الشظايا المنشقة تحمل الفوسفور ٣٢ أى المشع فى الطرف O^1. وبعد عمل فصل الهجرة الكهربائى كما تم عمله فى الطريقة السابقة تماما أى طريقة سانجر وكولسون ثم عمل التصوير الأشعاعى الذاتى لتوضيح الشظايا المشعة. فإن تتابع النيوكليوتيدات يمكن قراءته من صورة التصوير الأشعاعى الذاتى تماما كما فى حالة سانجر وكولسون.



شكل ٩٢: كيفية معرفة نيوكليوتيدات دنا sequencing DNA بواسطة طريقة التحليل الكيماوى chemical degradation method.

كيفية معرفة تتابع القواعد فى جزيئ دنا طويل:

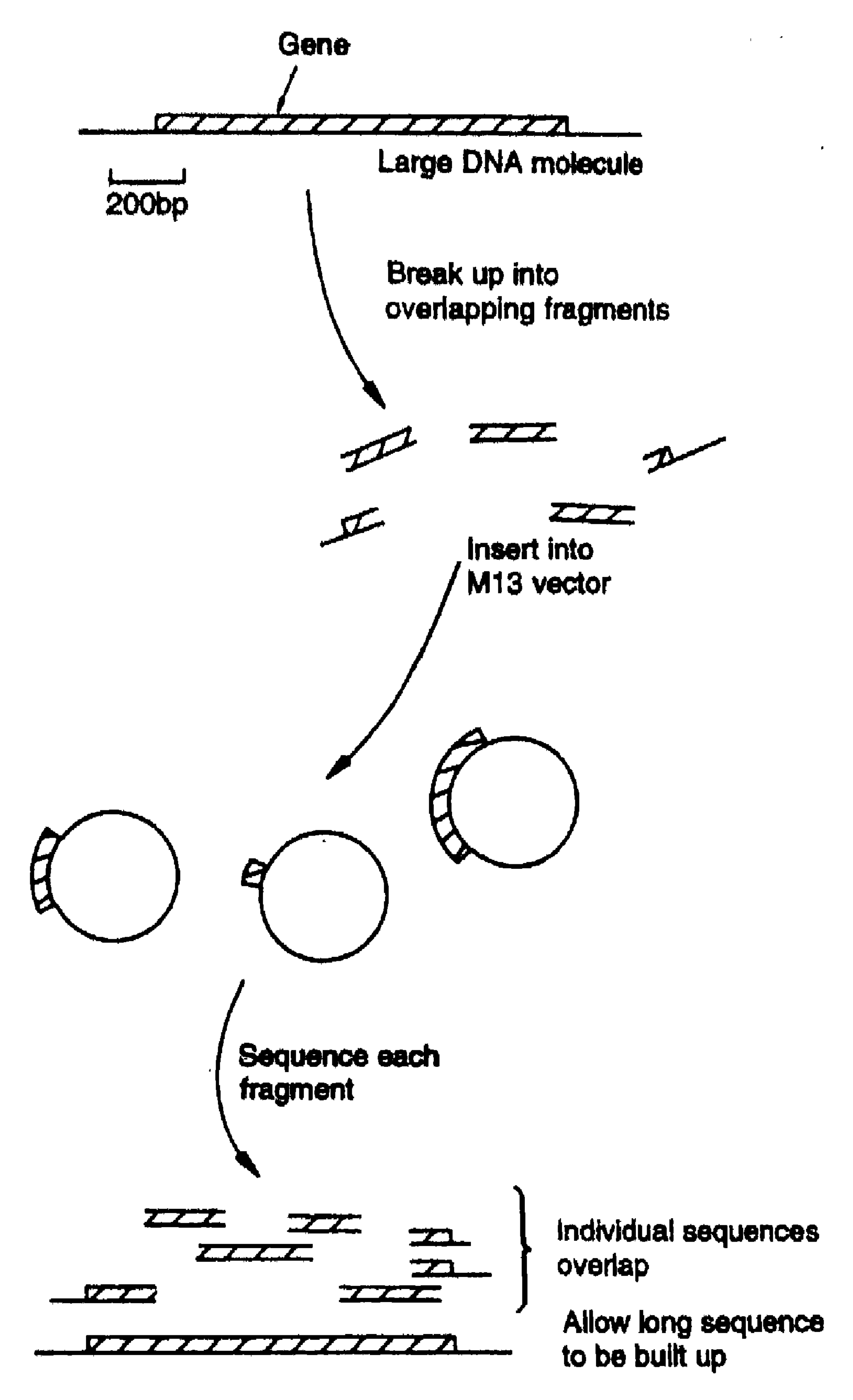
Building up a long DNA sequence:

فى الطريقتين السابقتين لا يمكن التعرف على تتابع للقواعد يزيد عن ٤٠٠ نيوكليوتيدة ولكن أغلب الجينات أطول من ذلك ولذلك لا يمكن التعرف على هذه الجينات الطويلة بهاتين الطريقتين. وفى هذه الحالة يتم تجزيئ هذا الجين الطويل إلى عديد من الشظايا (شكل ٩٣) ثم إدخال هذه الشظايا فى ناقل وسيط M13 ويجب أن تكون هذه الشظايا متداخلة وبحيث أن يكون تتابع القواعد فى شظية متداخل فى تتابع قواعد لشظية أخرى وكذلك بالنسبة للشظايا الأخرى. ثم يتم التعرف على مواقع التداخل بالعين المجردة أو بإستخدام الكمبيوتر وبعد ذلك يمكن بناء تتابع القواعد فى الجين الطويل بعد ترتيب تتابع القواعد فى هذه الشظايا كل على حدة وأمكن حل ذلك باستخدام تداخل الشظايا والقواعد overlapping.

توجد طرق عديدة لإنتاج شظايا متداخلة مثال ذلك أن جزيئ دنا يمكن شقه أى قطعه إلى أجزاء بواسطة إنزيمين قطع مختلفين وهما Sau 3A و Alu I (شكل ٩٤). هذه طريقة تقليدية لعمل تتابع للقواعد متداخل ولكن لها عيوبها ومنها أن أماكن القطع تكون غير مناسبة أو ليست فى الأماكن المطلوبة تماما ولذلك يمكن أن توجد شظايا أطول من اللازم وبذلك لا يمكن قراءتها. عادة يستعمل أربعة أو خمسة إنزيمات قطع r. e. فى الجين الطويل. عامة لازالت هذه أسهل طريقة للتعرف على تتابع القواعد فى جين طويل أو جزيئات دنا طويلة.

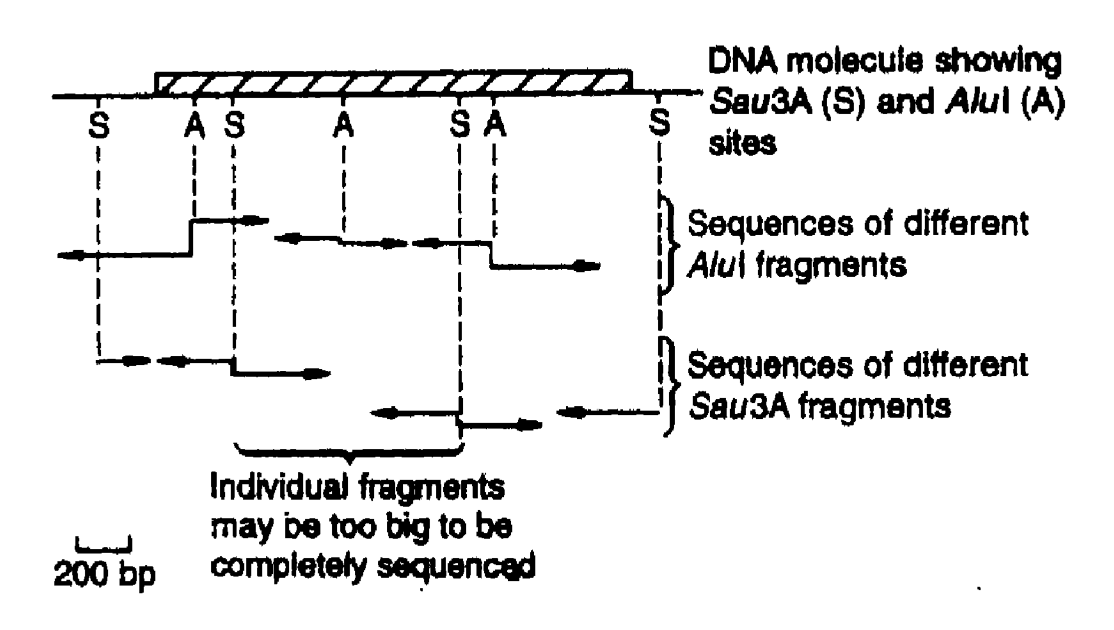
أهمية معرفة تتابع القواعد The achievements of DNA sequencing :

أول جزيئ دنا تم التعرف على تتابع القواعد فيه كان جينوم الفاج φx 174 والذى يحتوى على ٥٣٨٦ نيوكليوتيدة وكان ذلك ١٩٧٥ وبعد ذلك تم التعرف على تتابع ٥٢٤٣ زوج قاعدة للفيرس SV40 فى عام ١٩٧٧ ثم ٤٣٦٣ زوج قاعدة فى البلازميد pBR322 فى عام ١٩٧٨.



شكل ٩٣: بناء سلسلة طويلة من دنا من مجموعة (سلسلة) من شظايا متداخلة a .series of short overlapping ones

وبعد ذلك تدريجياً أمكن التعرف على تتابع القواعد فى جزيئات دنا أكبر. عرف سانجر ومساعدوه تتابع القواعد فى جينوم ميتوكوندريا الإنسان وهى ١٦,٦ كيلو قاعدة عام ١٩٨١ ثم ذلك فى الفاج لامدا وهو ٤٩ كيلو قاعدة عام ١٩٨٢. حاليا أمكن التعرف على أطوال من ١٠ إلى ٢٠ كيلو قاعدة بسهولة كبيرة وكعمل روتينى. أما العمل الآن فهو محاولة التعرف على تتابع القواعد فى الجينوم الكامل للكائن الحى. يجرى الآن محاولات ناجحة للتعرف على ذلك فى الإنسان Human Genome Project وقد أمكن التعرف بالكامل على تتابع القواعد فى جينوم خميرة الخباز. المعلومات الناتجة عن تتابع القواعد فى الكائنات الحية ستكون بلا شك ذات فائدة عظيمة لعلماء البيولوجيا الجزيئية فى أوائل القرن الحادى والعشرون ويمكن أن تفتح الأفق لمجالات عظيمة وفوائد جمة. حيث أن المعلومات عن تتابع القواعد وترجمتها وتجميعها تعتبر ثروة عظيمة للمستقبل.



شكل ٩٤: بناء تتابعات طويلة من جزيئ دنا long DNA sequence وذلك بإستخدام وتحديد تتابعات شظايا متداخلة Sequences of overlapping restriction fragments

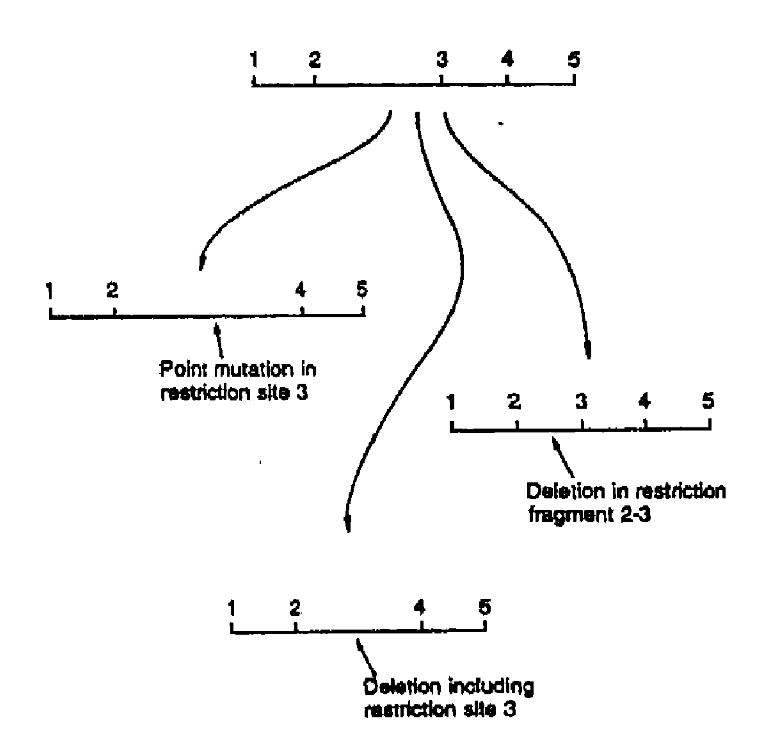
أستخدام الجينات الموطنة لدراسة تركيب الجينوم

Using Cloned Genes To Study Genome Structure

يعتبر من الأهمية بمكان معرفة تتابع القواعد لكى يمكن التعرف على تركيب الجين أو الجينوم ولكن هل هذا هو الحل الوحيد لدراسة تركيب الجين أو الجينوم؟ الإجابة لا حيث أن كثير من الجينات والجينومات فى الكائنات الحية غيـر معـروف تركيبهـا بالتفصيل ولكن يمكن التعرف عليها بطرق غير مباشرة. ومن مميزات هذه الطـرق أنها سريعة ويمكن أن تقارن بها عينات كبيرة وفيما يلى شرح لإحدى طريقتين مـن هذه الطرق وهى RFLP أىrestriction fragment length polymorphism وطريقة بصمة الأصبع الوراثية genetic fingerprinting.

١ – طريقة تحليل تعدد أشكال أطوال شظايا القطع RFLP:

لو أن جزيئين دنا متشابهين إلى حد كبير ويختلفان فقط فى قليل من تتابع القواعد أى أنهما غير متماثلين غير أخويين يمكن التعرف على ذلك من مقارنة خرائط القطع الخاصة بهما ويوجد ٣ إحتمالات لذلك وليس إحتمال واحد لذلك (شكل ٩٥).

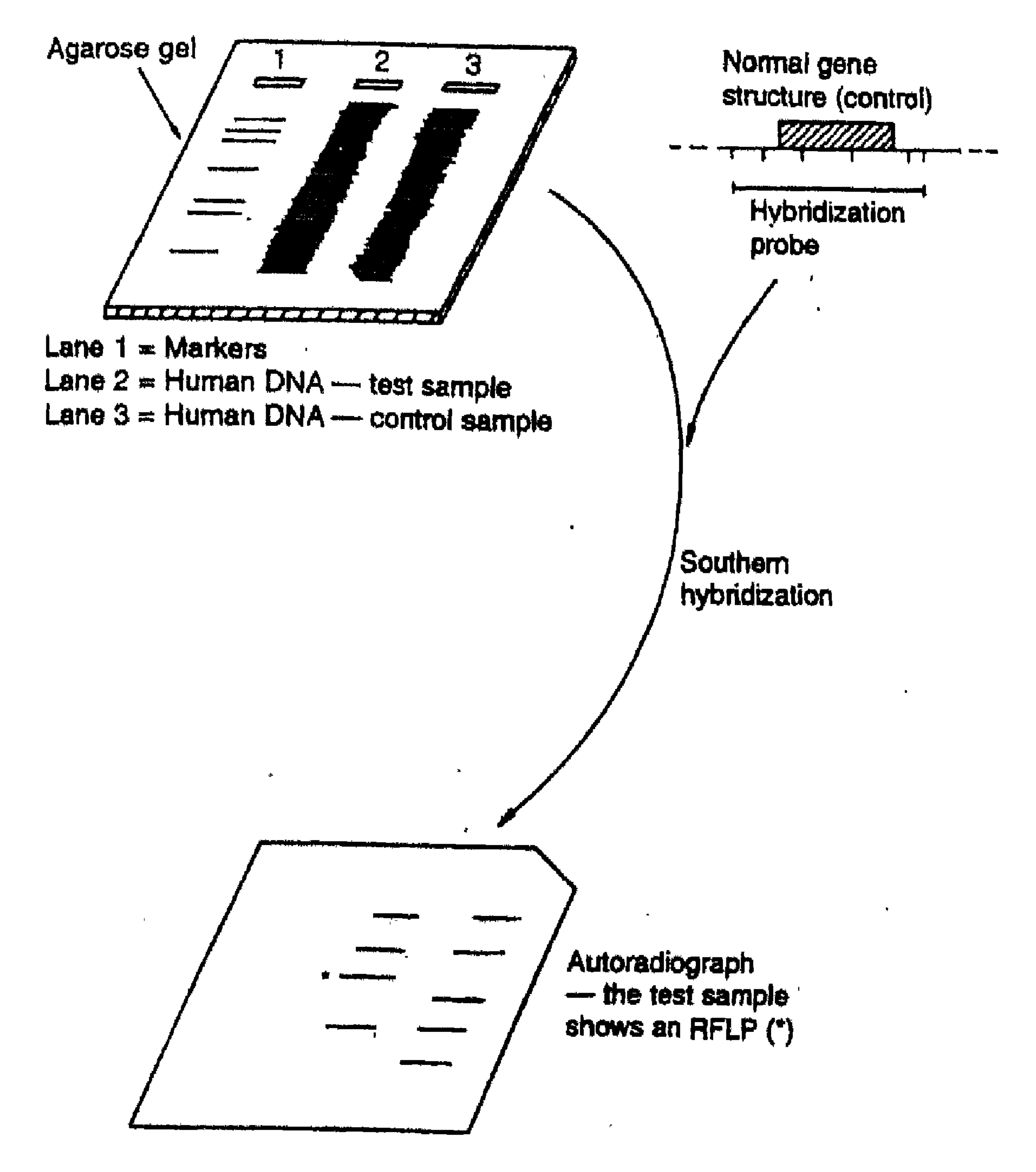


شكل ٩٥: تأثير حدوث الطفرات على خرائط القطـع (التحديـد) لجزيـئ دنـا. restriction map of DNA molecule.

حيث أن كل إحتمال ينتج عنه طول معين لشظية أى لجزء من دنا معين نتيجة طفرة. ويمكن التعرف على ذلك لو أن الشظايا أو هذه الأجزاء المعينة تم فصلها بواسطة فصل الهجرة الكهربائية gel e. p. ولكن المشكلة فى ذلك أنه فى كثير من الكائنات الحية أن الشظية الواحدة لا يمكن رؤيتها بعد الفصل بالهجرة الكهربائية. ومثال ذلك أن قطع دنا الإنسان بواسطة *Eco* RI ينتج عنه سبعمائة ألف شظية تقريبا وينتج عنها smear فى جل الأجاروز ولا يمكن تمييز الحزم فيها ولا يمكن حتى تمييز ولو حزمة واحدة.

ولذلك فإنه توجد خطة متوقفة على إستخدام طريقة تهجين صزرن southern hybridization. حيث أن ناتج هضم دنا فى أماكن القطع restriction digest يتم فصلها بفصل الهجرة الكهربائية بالطريقة العادية، ولا يتم رؤيتها بإستخدام صبغة بروميد الإثيديم، أى لا يحدث ذلك، ولكن يتم نقل الكتلة الناتجة smear وهى عبارة عن مجموعة الشظايا إلى غشاء نيلون أو نيتروسيلسلوز وذلك بواسطة طريقة نقل صزرن Southern transfer وهى تسمى أيضا صزرن Southern blotting (شكل ٩٦) ثم يتم عمل التهجين بإستعمال مجس والذى يمكنه التعرف على المكان المعين المحدد حيث يحدث إلتصاق المجس المعلم المشع بالمكان المطلوب أو الأجزاء المطلوبة أو الشظيات المطلوبة ويحدث لها إضاءة تسمى lighting up. حيث أنه ويمكن التعرف على المكان بالتصوير الأشعاعى الذاتى. بعد ذلك يمكن مقارنة صورة التصوير الأشعاعى للطفرات الثلاثة مع صورة الجين العادى الغير متطفر حيث يتم مقارنة الأطوال فى نظام الحزم RFLP banding pattern بالأطوال فى نظام الحزم فى الجين العادى الغير متطفر وبذاك يمكن تحديد التغيرات نتيجة للطفرات.

تستخدم هذه الطريقة بكثرة فى البيولوجيا الجزيئية ومن أهم هذه الإستعمالات هو عمل بروجرام لحصر وتحديد طفرات الجين فى الإنسان screening programmes for human gene mutations والتى ينتج عنها أمراض وراثية.



شكل ٩٦: عينة من دنا الإنسان يتم فحصها بطريقة restriction fragment length polymorphism.

يمكن تحليل ذلك والتعرف عليه لو أن الطفرة المسئولة عن المرض الوراثى تسبب RFLP ويحدث ذلك فى طفرات النقص deletion وطفرات الإدخال والزيادة insertion وأيضا الطفرات النقطية (الموضعية) point mutations والتى ينتج عنها فقد موقع القطع والتحديد restriction- site. وجود RFLP يعتبر دليل مباشر على أن

الجين معيب أى معيوب وأن الفرد يمكن أن يعانى من مرض وراثى. ولكن لسوء الحظ فإن قليل من الأمراض الوراثية يمكن التعرف عليها بهذه الطريقة وذلك ليست نتيجة قصور فى RFLP أو أن الحالات التى يمكن التعرف عليها بهذه الطريقة نادرة أى أن حدوثها فى الإنسان نادر ولكن لأن معرفتنا بالجينات العادية والتى تستخدم فى المقارنة ضعيف ولذلك بماذا سنقارن RFLP. وبالرغم من ذلك فإن هذه الطريقة أستخدمت بكفاءة عالية فى التعرف على أنواع عديدة من أمراض thalassaemia والتى تنتج عن عيوب فى جينات الجلوبين globin genes وأيضا فى التعرف على بعض أمراض سيولة الدم haemophila.

توجد طريقة أخرى تستعمل بكثرة ومفيدة وهى طريقة تحليل الإرتباط فى وجود تعدد أطوال شظايا القطع RFLP linkage analysis. وهذه الطريقة لا تعتمد على وجود RFLP مباشرة ونتيجة مباشرة للعيب الوراثى للجين المعيب ولكن تحتاج إلى حالة RFLP بالقرب من الجين المعيب أو ملاصقة له بحيث يكون الإرتباط بينهما واضح وكبير ولذلك لا يحدث إنعزال بين الجين المعيب وبين حالات RFLP أثناء الإنقسام الإختزالى وهكذا يورث الجين المعيب مع RFLP. وهكذا فى هذه الحالة تشخيص حالة RFLP تكون دليل على وجود المرض الوراثى أى الجين المعيب وليست تشخيص المعيب ذاته.

٢ – بصمة الأصبع الوراثية Genetic Fingerprinting:

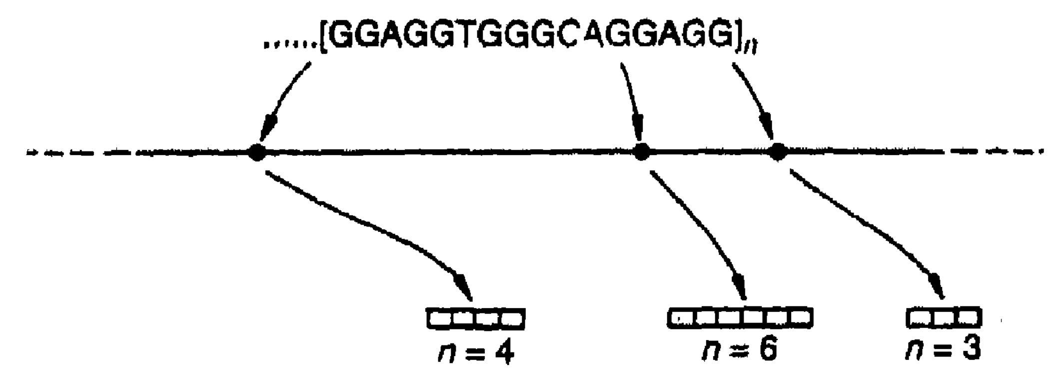
تعتبر طريقة بصمة الأصبع الوراثية نوع متخصص من RFLP حيث يعطى فكرة عامة عن تركيب الجينوم بصفة عامة وليست حالة مفردة كما فى RFLP. تفحص بصمة الأصبع الوراثية عدد كبير من RFLP مرة واحدة. أحد طرق إنجاز ذلك أن يتم عمل مجس مختلط a mixed probe يتم عمله أو تخليقه من أجزاء مختلفة عديدة من جزيئات دنا وبذلك يكون الهدف عديد من المواقع فى الجينوم. ولكن فى كثير من بصمة الأصبع الوراثية تكون الحالة أكثر رقة ودقة subtle عن ذلك. عادة

يكون الهدف عبارة عن تكرار مزدوج tandem repeats وكل منها يتكون من تتـابع قصير من القواعد أو يزيد طولا حتى يصل حوالى ٦٤ زوج من القواعد فى الطـول ويتم تكرار حدوث ذلك مكررا لمرات عديدة (شكل ٩٧). توجد خاصيتين أساسـيتين لهذا التكرار المزدوج tandem repeats والذى يكـون الأسـاس لبصـمة الأصـبع الوراثية:

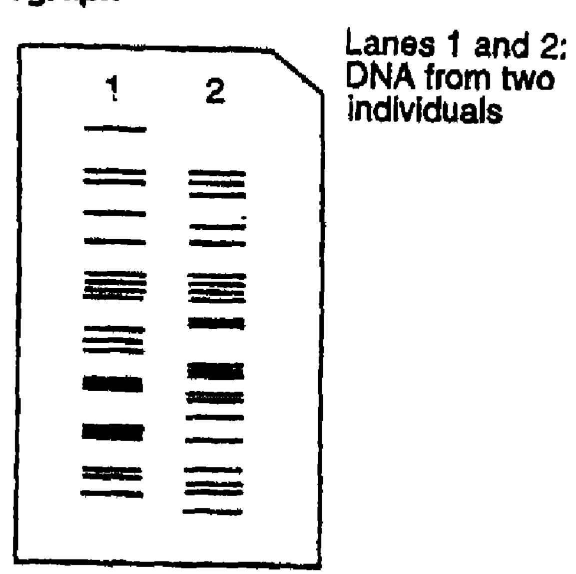
(a) Tandem repeats

..........CGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTA..........

(b) There may be several arrays of identical repeats



(c) The resulting autoradiograph



شكل ٩٧: بصمة الأصبع الوراثية Genetic fingerprinting.

١ – يوجد عديد من التكرارت المتشابهة أو المتماثلة وتسمى بتتابعات القلب core موجودة على أماكن عديدة من الجينوم. يعنى ذلك أن مجس واحد خاص بأساس أو قلب core تتابع القواعد يمكن أن يستعمل للتعرف على عديد من RFLP مرة واحدة أى فى وقت واحد.

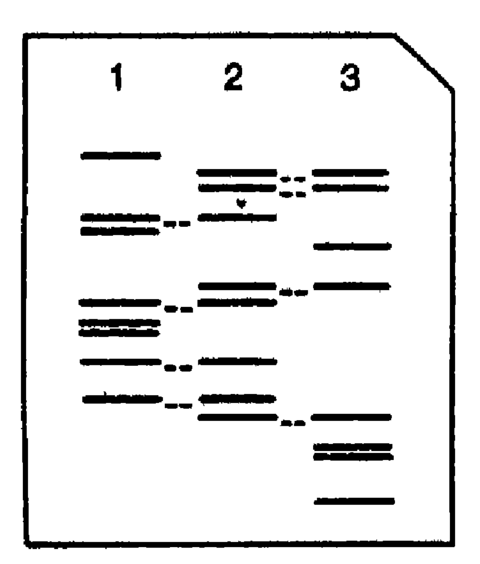
٢ – عدد وحدات التكرار فى الصف الواحد أو العمود الواحد يختلف بدرجة كبيرة جدا the number of repeat units in a single array is hypervariable.

معنى ذلك أن الصفوف تظهر RFLP بتكرارية عالية.

يتم إجراء طريقة بصمة الأصبع الوراثية تماما كما فى طريقة RFLP. حيث أن دنا الجينوم بواسطة r. e. يتم تجزيئه ثم فصله بالهجرة الكهربائية ثم نقله إلى غشاء نيلون أو نيتروسيلليوز ثم يتم الجس والتهجين بالمجس. والإختلاف بين طريقة بصمة الأصبع الوراثية وبين RFLP أن الأولى لا تظهر نظام بسيط لأربعة أو خمسة أشرطة كما هو الحال فى RFLP بل يوجد نظام معقد للحزم أى الأشرطة a complex pattern of bands يظهر فى autoradiograph وحيث يوضح ذلك أن المجس يلتصق أى يهجن عديد من الصفوف arrays فى عديد من المواقع المختلفة فى الجينوم ولذلك فإن نظام الحزم فى فردين مختلفين من الإنسان مثلا أو من الدروسوفيلا مثلا أو من القمح أو القطن مثلا لا يكونا متماثلين على الإطلاق (إلا حالة واحدة إذا كانا من زيجوت واحد monozygotic كما فى حالة الأجنة المتماثلة كما فى الأشقاء المتماثلين وراثيا identical twins فى الإنسان أو الحيوان والتى تنشأ من بويضة مخصبة بحيوان منوى واحد كما فى حالة بعض النباتات مثل الصنوبر من النباتات عاريات البذور ومثل بعض الأوركيدات فى النباتات مغطاة البذور أى النباتات الزهرية وكما فى بعض حالات مزارع الأنسجة فى النبات وحالات الإستنساخ فى الحيوان كما فى دوللى وغيرها!!! والإنسان ؟؟!!) لأن الإختلافات hypervariability موجودة فى كل مكرر فى العمود.

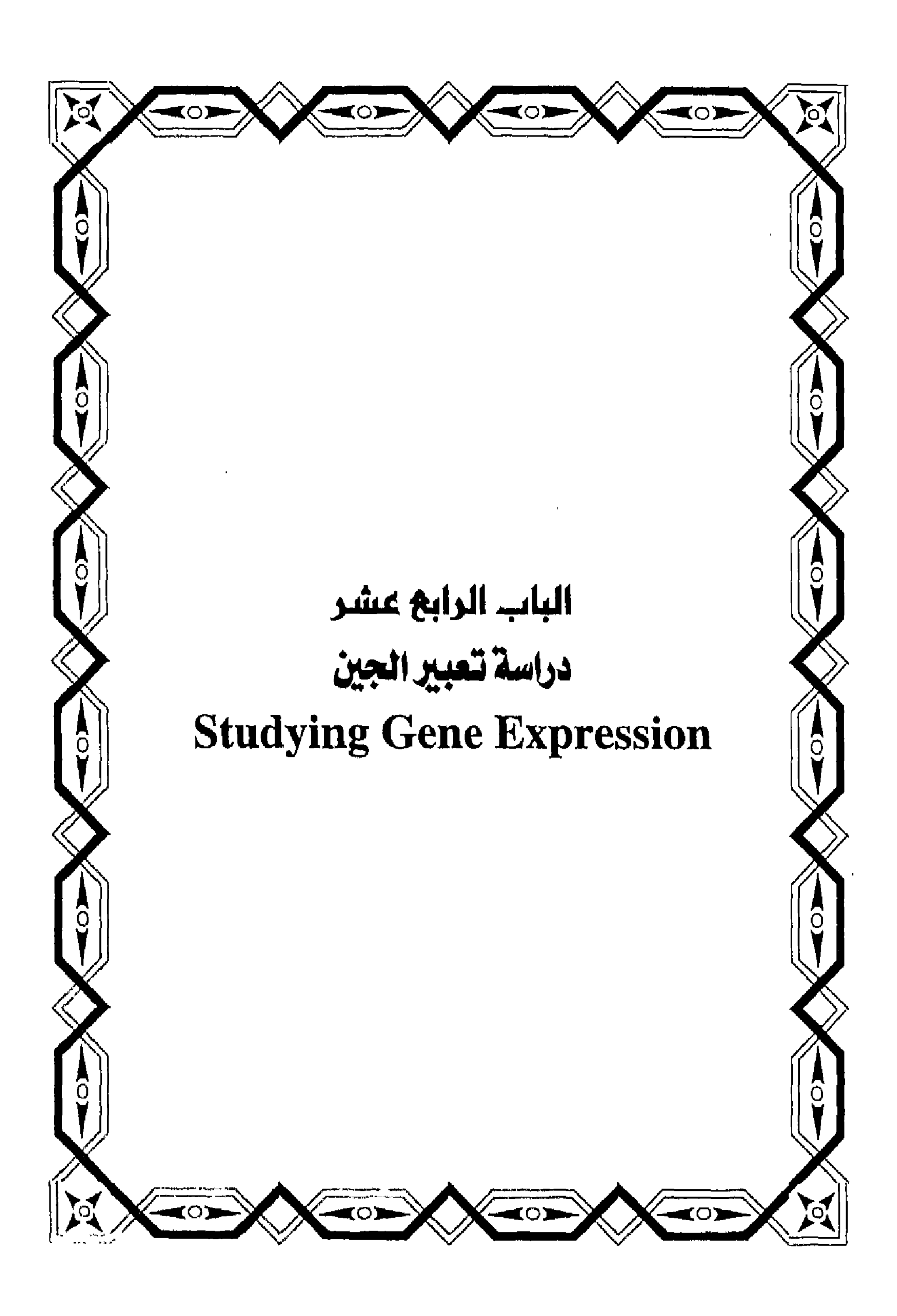
تستخدم طريقة بصمة الأصبع الوراثية فى المحاكم والقضايا حيث أنه من النادر جدا أن يكون شخصين مختلفين غير متماثلين وراثيا لهما نفس بصمة الأصبع الوراثية حيث تكون النسبة واحد لكل عديد من المليونات. حيث أن المقارنة أو التطابق بين بصمة الأصبع الوراثية للمذنب أو القاتل أو المتهم وبين الشعر أو الدم الوجود فى مسرح الجريمة أو السرقة يكون لها دور كبير فى التعرف على المتهم. تستخدم هذه الطريقة بكثرة فى أثبات البنوة فى المحاكم حيث أن الإبن أو الإبنة لهما بصمة أصبع وراثية خاصة بها ولكن بعض الحزم تطابق الأم وبعض الحزم تطابق الأب (شكل ٩٨). تستخدم هذه الطريقة بكثرة فى الطب الشرعى.

تستخدم بصمة الأصبع الوراثية أيضا فى الحيوانات فى خيول السباق وتنسيب الكلاب البوليسية أو كلاب الحراسة ودراسة عشائر الطيور والحيوانات.



Lane 1 = Mother
Lane 2 = Daughter
Lane 3 = Father

شكل ٩٨: يتشابه الإبن أو البنت (الأبنة) فى genetic fingerprints للأبوين. لاحظ الأبنة صفاقها أو bands خليط من الأبوين.



الباب الرابع عشر

دراسة تعبير الجين

Studying Gene Expression

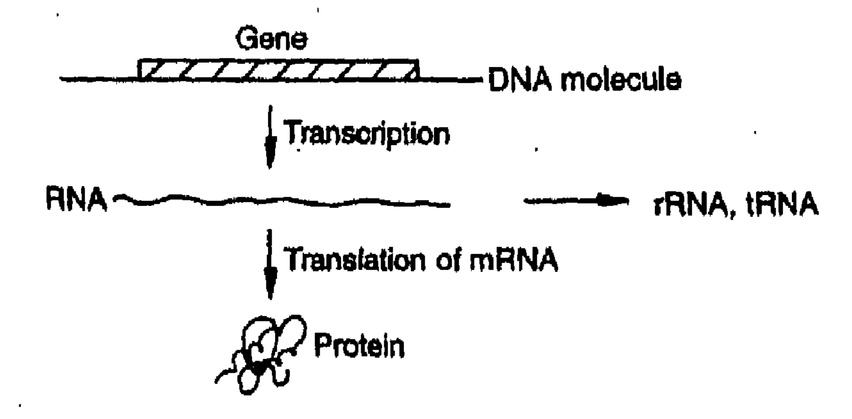
الباب الرابع عشـــر
دراسة تعبير الجين
Studying Gene Expression

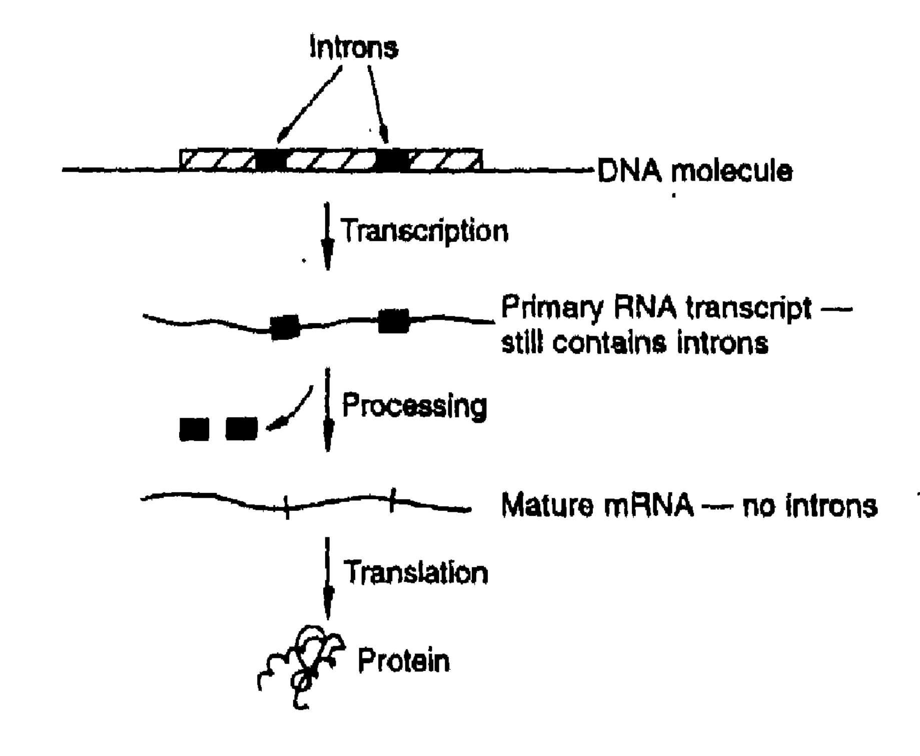
لابد أن تعبر الجينات عن نفسها لكى تصبح مؤدية لدورها ووظيفتها (شكل ٩٩). وإذا لم تعبر عن نفسها تعتبر خاملة أى غير نشطة أى أنها موجودة ولكن غير معبرة عن نفسها بمعنى آخر من وجهة نظر الوراثة والكيمياء الحيوية تعتبر ليس لها وجود. ولكن يلاحظ أن بعض الجينات قد يكون له دور فى بعض أوقات أو أعمار الكائن الحى ويكون خامل فى مراحل أخرى من الكائن الحى. عادة لا تكون أعداد كبيرة من الجينات خاملة تماما فى جميع مراحل الكائن الحى. وأول مرحلة فى تعبير الجين عن نفسه هو نسخ الجين وتكوين حلزون رنا تكميلى complementary RNA strand. وهكذا فإن بعض الجينات مثل الجينات المسئولة عن تكوين رنا ناقل أو رنا ريبوسومى يكون نسخ الجين هو الناتج النهائى للجين حيث يتكون رنا تكميلى ومنه يتكون رنا ريبوسومى أو رنا ناقل وفى جينات أخرى فإنه يتكون رنا رسول من عملية النسخ وبعد ذلك تحدث عملية الترجمة لتكوين البروتين فى النهاية. أى فى حالة رنا ريبوسومى ورنا ناقل تكون عملية النسخ هى البداية والأساس ولكن فى البروتينات تكون عملية النسخ هى البداية وتكون عملية الترجمة هى النهاية وأساسية أيضا (شكل ٩٩).

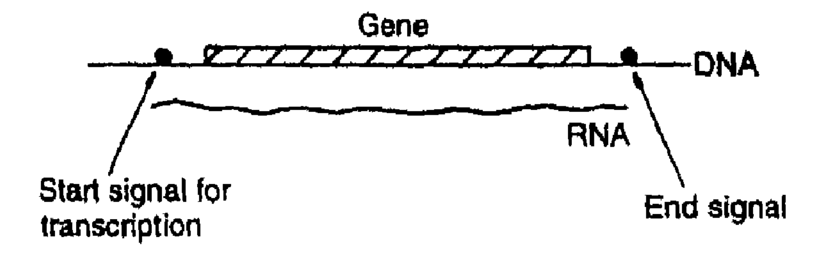
ولكى يتم التعرف بالتفصيل عن كيفية تعبير الجين عن نفسه فيجب دراسة عملية نسخ رنا، ومنها على وجه الخصوص هل رنا الناتج عن تركيب الجين الكامل تماما أما أن رنا الناتج يوجد منه أجزاء خاصة ناقصة وتسمى هذه الأجزاء الناقصة بالإنترونات introns (شكل ٩٩)، ومن المهم دراسة تركيبها بالتفصيل ودراسة إمكانية أن يكون لها وظيفة معينة. بالإضافة إلى ذلك يجب أيضا معرفة مواقع البداية والنهاية لعملية النسخ. ولذلك فإن عملية النسخ وأغلب المنسوخات transcripts تكون نسخ من الجين نفسه وأيضا المناطق المتاخمة له على جانبيه أى مواقع البداية

والنهاية. العلامات the signals الخاصة بمواقع البداية والنهاية لعملية النسخ مفهومة جزئيا وليست تماما، ولكن لابد من تحديد مواقعهم عند دراسة تعبير الجين الموطن عن وظيفته. أى لابد من تحديد موقعهم عند دراسة وظيفة الجين.

سيتم الحديث عن الطرق المستخدمة فى تحليل المنسوخ transcript analysis. تستخدم هذه الطرق لتحديد هل يحتوى الجين الموطن على إنترونات أم لا وأيضا تحديد مواقع البداية والنهاية اللازمة للنسخ. سيتم شرح قليل من الطرق الحديثة المستخدمة فى السنوات الحالية لتوضيح كيفية تنظيم تعبير الجين الموطن عن نفسه وعن وظيفته. وهذه الدراسات هامة لأن الإختلال أو الإختلافات التركيبية فى الجين gene aberrations قد ينتج عنها أمراض للإنسان أو الحيوان أو النبات. كما سيتم شرح كيفية تحديد ناتج الترجمة للجين الموطن.







شكل ٩٩: بعض الأساسيات عن تعبير الجين عن نفسه Some fundamentals of gene expression.

دراسة منسوخ الجين الموطن
Studying The Transcript of A Cloned Gene

أغلب طرق تحليل النسخ المستعملة مبنية على التهجين بين رنا المنسوخ وبين جزء من دنا المحتوى على الجين الوطن. يحدث التهجين بسهولة بين شريطين فرديين من دنا أيضا بين شريط دنا وشريط رنا. يمكن فحص ناتج التهجين بين دنا ورنا بواسطة المجهر الإلكترونى أو بواسطة إنزيم نيوكلييز متخصص لحلزون واحد من دنا single- strand specific nucleases.

المجهر الإلكترونى وجزيئات دنا :
Electron microscopy of nucleic acid molecules

يمكن رؤية حلزون دنا أو جزيئ رنا بالمجهر الإلكترونى وذلك بعد معاملته كيماويا لزيادة قطرة وبدون هذه المعاملة يكون قطر الحلزون صغيرا جدا وقد لا يمكن رؤيته. وفى هذه الحالة يتم خلط جزيئات دنا بالبروتين مثل سيتوكروم C والذى يلتصق بالحلزون ويغلفه بغلاف سميك. الحلزون المغلف يجب صبغه بصبغة مناسبة ليمكن رؤيته (شكل ١٠٠) وهذه الصبغة مثل خلات اليورانيل uranyl acetate أو معاملته معاملة معينة بمواد electron- dense material. وبهذه المعاملات يمكن رؤية عينات من جزيئات دنا أو رنا.

قديما كان يستخدم ذلك لفحص التهجين بين حلزونى دنا ولكن يستخدم الآن فى التهجين بين دنا ورنا. ويستخدم ذلك بكفاءة عالية لمعرفة هل الجين يحتوى على إنترونات أم لا. لو أن جين يحتوى إنترونات فإن التهجين بين حلزون من هذا الجين ومنسوخ رنا RNA transcript سيكون التهجين غير تام أى تهجين جزئى. حيث أن إنترونات أجزاء دنا ستكون دائرة غير كاملة أى حلقة غير كاملة بارزة "loop out" حيث لا يوجد مايقابلها مع رنا فى حين أنه يوجد إزدواج بين الإكسونات ورنا. ولذلك يمكن رؤية الإنترونات بسهولة بالمجهر الإلكترونى (شكل ١٠١).

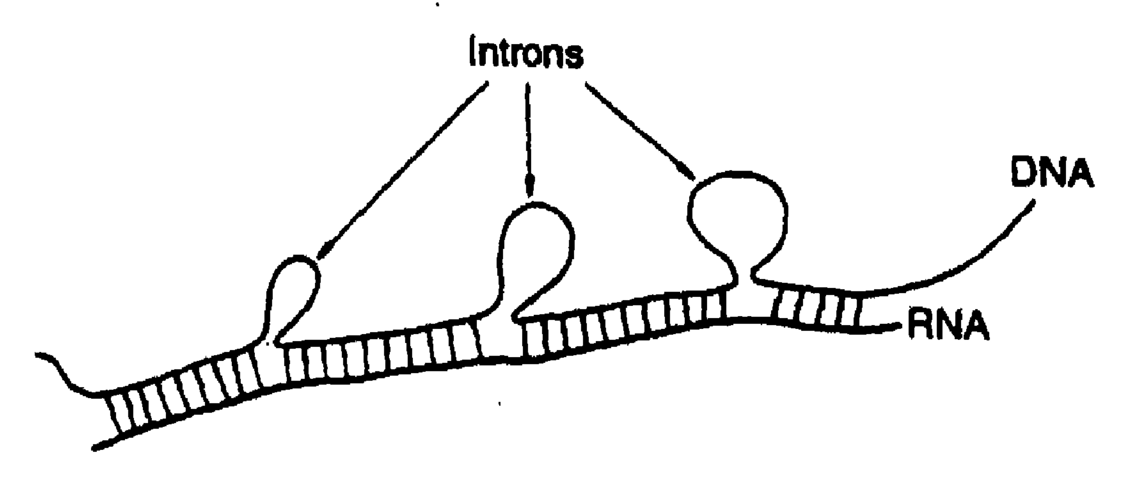
DNA molecule
in cross-section

Cover with protein
molecules

Stain with electron-dense
material

Visible with the
electron microscope

شكل ١٠٠: تحضير جزيئ دنا لتهيئة فحصه بالمجهر الإلكترونى.



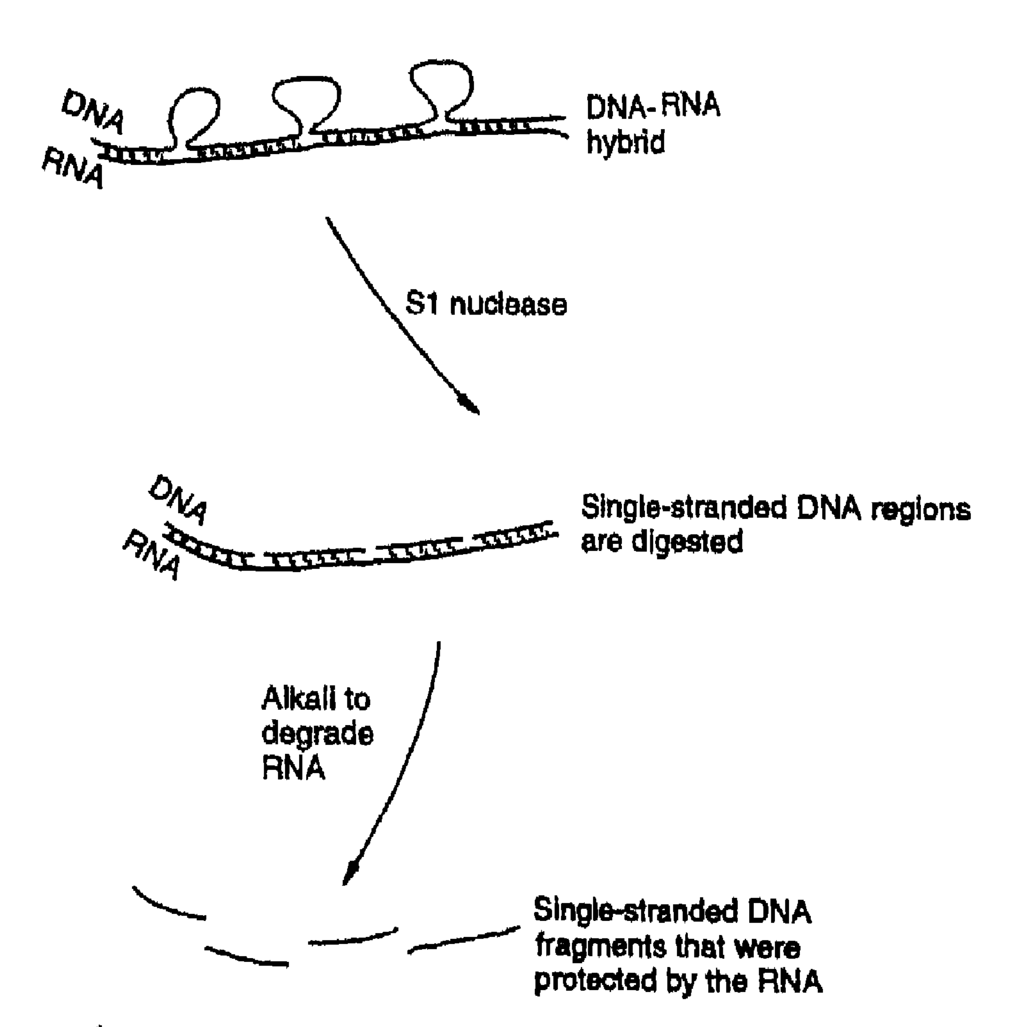
شكل ١٠١: شكل التهجين بين دنا ورنا بالمجهر الإلكترونى DNA-RNA hybrid بين جين يحتوى إنترونات ورنا الخاص به المعامل والمجهز its processed transcript.

يعبر عدد الحلقات عن عدد الإنترونات وأيضا يوضح مكانها فى الجين. يمكن عمل تحليل للجين sequencing لتوضيح خضائص المناطق التى تحد الإنترونات أى حدودها. عند توفر دنا التكميلى للجين الموطن cDNA فإنه يمكن مقارنة تتابع القواعد فيه بتتابع القواعد فى الجين وهكذا يمكن معرفة موقع الإنترونات بالتفصيل.

تحليل التهجين بين دنا ورنا بواسطة المعاملة بإنزيم nuclease النيوكلييز:
Analysis of DNA- RNA hybrids by nuclease treatment

تستخدم فى هذه الطريقة إنزيم نيوكلييز معين مثل S1 خاص بهضم الحلزون المفرد لدنا أو شريط رنا المفرد بالطبع، أى يهضم الأجزاء المفردة وليست المزدوجة سواء كان ذلك لدنا ثنائى الحلزون أو الهجن دنا ورنا. ولكن هذا الإنزيم يهضم أيضا الأجزاء وحيدة الحلزون الموجودة فى أطراف أو نهايات الجزيئات ثنائية الحلزون سواء لدنا أو الهجن دنا ورنا. فعند تهجين جزيئ دنا يحتوى جين تم تهجينه مع منسوخة رنا RNA transcript وبعد ذلك تم معاملته بواسطة الإنزيم نيوكلييز S1 (S1 nuclease) فإن الأجزاء المفردة سواء الأطراف أو أشباه الحلقات البارزة الخاصة بالإنترونات يتم هضمها. تكون النتيجة تكوين جزيئ هجين دنا ورنا مزدوج حيث أن الأجزاء المفردة تم إزالتها بالإنزيم نيوكلييز S1. بعد ذلك يمكن إزالة رنا بواسطة المعاملة بقلوى مناسب (شكل ١٠٢) راجع ذلك فى الباب الأول. وهكذا يتبقى لدينا أجزاء أو شظايا من جزيئ دنا والتى تم حمايتها من الهضم بالإنزيم لإزدواجهما مع رنا.

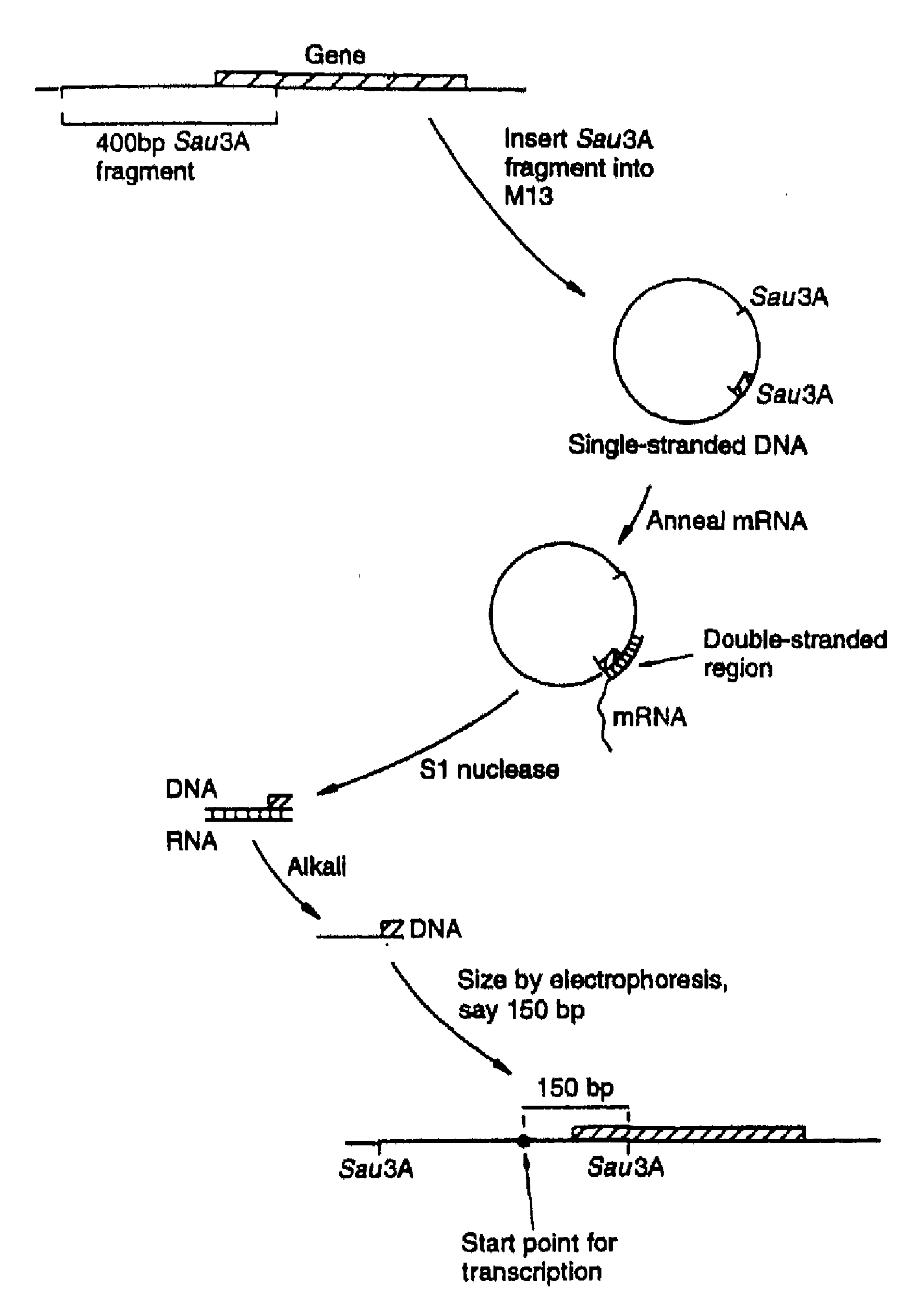
من عيوب هذه الطريقة أنه يمكن التعرف على أجزاء دنا وذلك بمعرفة أطوال الشظايا بواسطة فصل الهجرة الكهربائية ولكنها لا توضح ترتيب هذه الأجزاء أو الشظايا بالنسبة لبعضها أو مواقعها النسبية. يمكن عمل بعض التحويرات والتعديلات لهذه الطريقة بحيث أنها توضح مكان وموقع البداية والنهاية للمنسوخ أى لعملية النسخ كما تحدد عدد ومواقع الإنترونات على خريطة تتابع قواعد دنا وهى كما يأتى:



شكل ١٠٢ : تأثير إنزيم نيوكلييز S1 (S1 nuclease) على الهجين دنا أو رنا DNA-RNA hybrid

حيث أنه فى المثال التالى (شكل ١٠٣) فإن الجزء أو الشظية *Sau* 3A والتى تحتوى مائة زوج قاعدة لمنطقة التشفير coding region وثلاثمائة زوج قاعدة للقائد leader وهكذا فإن هذه الشظية تتكون من ٤٠٠ زوج قاعدة وهى تسبق الجين تماما.

يتم تعبئة هذه الشظية فى الناقل الوسيط M13 على هيئة شريط مفرد أى خيط مفرد. ثم تضاف عينة من جزيئ رنا منسوخ RNA transcript (mRNA) ويسمح لها بالتزاوج حيث أنه يتوافق ويتزاوج مع جزء من شظية دنا المنقولة والمعبئة والملتحمة مع M13. سيظل جزء من شظية دنا المنقولة مفردة ولكن سيوجد جزء صغير منه مهجن مع رنا أى يكون محمى من الإنزيم المنيوكلييز S1.



شكل ٣٠١ : تحديد موقع بداية النسخ بواسطة خصائص بانزيم نيوكلييز S1

Locating a transcription start point by S1 nuclease mapping

ثم بعد ذلك يتم عاملة بالإنزيم نيوكلينيز S1 فيتم هضم وتحليل أغلب الشظية (الجزء المفرد) عدا الجزء الهجين من الشظية (الجزء المزدوج مع دنا) دنا رنا والمحمى من الإنزيم. وبعد ذلك يعامل الهجين دنا ورنا بالقلوى المناسب فيسبب تحليل رنا ويبقى جزء دنا مفرد صغير الحجم. عند فحص المعاملات السابقة بدقة فإنه يكون من الواضح أن الجزء من دنا وحيد الحلزون هو عبارة عن المسافة بين موقع بداية النسخ وحافة يمين الموقع *sau* 3A. يتم التعرف على طول هذا الجزء بفصل الهجرة الكهربائى وبذلك يمكن عمل توقيع لمكان البداية على تتابع القواعد فى جزيئ دنا.

يمكن إتباع نفس الطريقة لمعرفة مكان أى موقع النهاية لعملية النسخ وأيضا معرفة مواقع الإتصال بين الإنترونات والإكسونات ويكون الإختلاف الوحيد هو موقع القطع فى كل حالة.

طرق أخرى لدراسة منسوخات رنا :

Other techniques for studying RNA transcripts

توجد طرق أخرى تستعمل حديثا غير الطريقتين السابقتين (الفحص بالمجهر الإلكترونى أو إنزيم نيوكلييز S1 مثلا). حيث أن منسوخ رنا الإبتدائى primary RNA transcript والمنسوخ مباشرة من الجين يحدث له تحويرات وتعديلات كثيرة قبل أن يصبح منسوخ رنا ناقل ناضج mature mRNA. وقد وجد أن هذه التعديلات يمكن أن تكون بإزالة الإنترونات أو إدخال نيوكليوتيدات أو تحوير وتغيير تركيب النيوكليوتيدات الموجودة بالفعل. أكثر من ذلك أنه وجد أن بعض جزيئات رنا لها نشاط تحليلى أى محللة أى تقوم بنشاط التحليل possess catalytic activity. هذه الإكتشافات الحديثة المثيرة نشطت فكرة حدوث وتكوين طرق جديدة لتحليل النسخ transcript ويعتبر ذلك أحد الفروع التى تتقدم بسرعة فى الفروع المختلفة لتنقية دنا المعاد صياغته recombinant RNA technology.

دراسة قواعد تعبير الجين عن نفسه
Studying The Regulation Of Expression

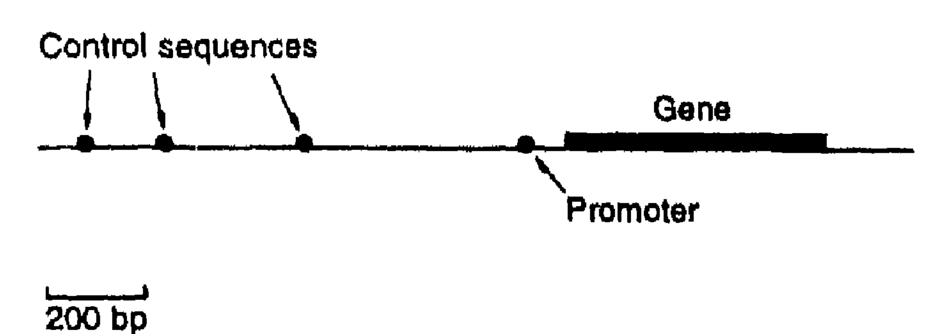
قليل من الجينات تعبر عن نفسها بإستمرار ولكن الغالبية العظمى تتبع قواعد معينة أو نظام معين حيث أنها تصبح نشطة عندما يتم الإحتياج إلى نواتج نشاطها وبعد ذلك تصبح خاملة أى أن الجين يمكن أن يكون نشط عند الإحتياج إلى نواتج نشاطه ثم يصبح خامل بعد ذلك أى غير معبر عن نفسه. ولذلك يقصد بالجين المعبر عن نفسه الجين النشط والجين الغير معبر عن نفسه بالجين الخامل. وهذا النشاط والخمول لجين معين يتبع قواعد معينة ونتيجة لظروف معينة. من أبسط طرق دراسة قواعد تعبير الجين عن نفسه موجودة ومدروسة فى البكتريا إ. كولاى والتي تتحكم فى تعبير الجين والجينات لعمل طرق التحول الغذائى المختلفة والعمليات الحيوية المختلفة وتبعا لذلك فإن ناتج أو نواتج الجين الغير مطلوبة لا يتم تحليلقها. مثال ذلك أن الجينات المسئولة عن تخليق الإنزيمات الداخلة فى تخليق التربتوفان يمكن أن تصبح خاملة عندما توجد كميات كبيرة من التربتوفان فى الخلية والعكس صحيح أى تصبح نشطة مرة أخرى عندما يقل تركيز التربتوفان. يشابه ذلك أيضا في حالة الإنزيمات المحللة للسكريات مثل اللاكتوز فإن تخليق الإنزيم ينشط فقد عندما يتواجد فى البيئة سكر اللاكتوز. هذا بالنسبة للبكتريا أما فى الفطريات فينطبق عليها نفس القاعدة ويمكن أن تقسم الإنزيمات تبعا لذلك إلى إنزيمات تفرز بإستمرار فى وجود أو عدم وجود مادة التفاعل وتسمى **constitutive enzymes** وإنزيمات تأقلمية **adaptive enzymes** وهى لاتفرز إلا فى وجود مادة التفاعل. وقد وجد المؤلف ذلك فى أنواع كثيرة من فطر فيوزاريوم **Fusarium** حيث أن من هذه الأنواع هى *F. oxysporum* و *F. semitectun*، و *Fusarium solani*، و *F. moniliforme* وهى لا تفرز إنزيم الأميليز إلا فى وجود النشا فى البيئة. أى أن إنزيم الأميليز فى هذه الحالة هو إنزيم تأقلمي. تعتبر قواعد تعبير الجين عن نفسه فى الكائنات الحية

الراقية أكثر تعقيدا، حيث أنه يتحكم فيها أكثر من جين وعادة يكون عديد من الجينات. مثال ذلك فإن حالة التميز أى التشكل للخلايا فى الأنسجة والأعضاء الحية تحتاج تغييرات جذرية فى نظام تعبير الجين عن نفسه وعادة تكون هذه التغيرات غير عكسية. ومثال ذلك أن تكوين الفرد البالغ أو الناضج من خلية واحدة وهى بيضة مخصبة بجاميطة مذكرة يشمل تنظيم لعمل الجين والجينات ويحتاج إلى تعاون بين الخلايا المختلفة وأيضا يحتاج إلى توقيت ووقت لعمل تغييرات فى التعبير عن الجين أى كل عملية لها وقت معين.

عديد من مشاكل قواعد تعبير الجين عن نفسه تحتاج إلى خلفية وراثية تقليدية حيث تحتاج إلى معرفة الجينات وتأثيرها ووظائفها وأيضا معرفة الإشارات الكيموحيوية biochemical signals والتي تؤثر على نشاط الجين وتعبيره عن نفسه وأيضا توضح التفاعلات بين الجينات المختلفة وبين عائلات الجينات وتبعا لذلك فإن من أهم الكائنات المستعملة في معرفة أهمية الدور الكيموحيوى للجينات فى الكائنات الراقية تبدأ من الدروسوفيلا ميلانوجاستر. كما أن لفطر *Neurospora* دور فى ذلك منذ بحوث Beadle ،Tatum في هذا الصدد. من المعروف أن الجين المنظم أى له دور فى تنظيم العمليات يكون له واحد أو أكثر من تتابع (control sequences) القواعد المعين يعتبر منظم أى كونترول control وذلك فى الجزء قبل الجين أى قبل بداية الجين upstream region (شكل ١٠٤).

وأن الجين يعمل أو يتوقف أى ينشط أو يصبح خامل وذلك نتيجة لإلتصاق بروتينات معينة تسمى بروتينات منظمة لهذه التتابعات control sequences. ومثال ذلك أن بروتين منظم regulatory protein يمكن أن يثبط تعبير الجين عند إرتباط الجين بتتابعات التنظيم control sequences (أى أماكن التنظيم التى تتكون من تتابع قواعد معين) أو أن البروتين المنظم على العكس يمكن أن ينشط الجين ليظهر تأثيره. وسيتم شرح كيفية تحديد أماكن التنظيم وشرح دورها فى قواعد تنظيم أو تعبير

الجين عن نفسه. ومن أمثلة الأسئلة الصعبة فى ذلك ما هو الذى يتحكم فى ربط البروتين المنظم مع تتابع القواعد أى مع مكان التنظيم والحقيقة أن الإجابة على هذا السؤال صعبة وخارج نطاق معرفة simple gene cloner وتعتبر مشكلة فى علم الوراثة.



شكل ١٠٤: تتابع القواعد المنظم المتحكم فى نشاط وفاعلية الجين. تتابع القواعد المنظم المتحكم يسمى control sequences. يوجد فى الشكل ثلاثة تتابعات لقواعد وعامة قد يوجد تتابع قواعد واحد أو أكثر.

تحديد مواقع إلتصاق البروتين على جزيئ دنا :

Identifying protein- binding sites on a DNA molecule

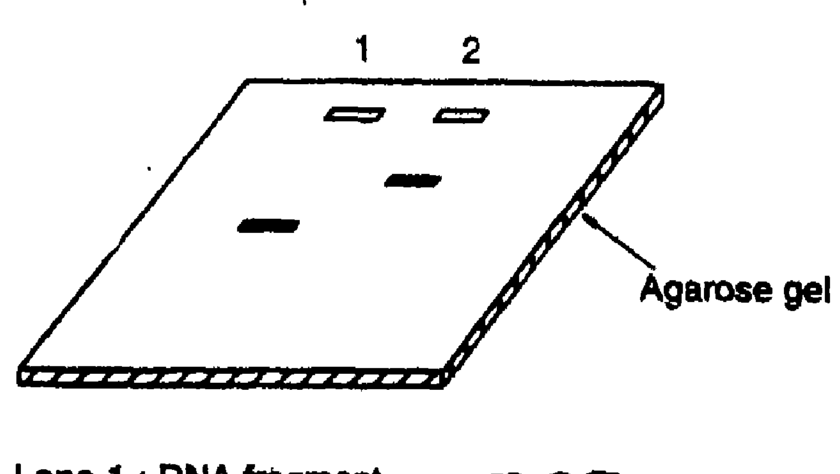
تتابع التنظيم control sequences وهو عبارة عن الجزء أو المنطقة من دنا والتى يمكن أن يلتحم بها بروتين منظم. ولذلك لابد من تحديد هذه المواقع upstream الجين الموطن وبمعنى آخر تتابعات التنظيمات المختلفة قبل بداية الجين الموطن upstream of a cloned gene وذلك بالبحث عن المنطقة المناسبة لإرتباط البروتين أو المناطق المناسبة لذلك. يوجد لذلك طريقتين مختلفتين ففى الأولى أن شظية دنا والتى لها بروتين مرتبط بها يمكن التعرف عليها بواسطة زيادة وزنها الجزيئى وفى الطريقة الثانية أن المنطقة الملتصق بها البروتين المنظم تكون مقاومة لفعل إنزيم endonuclease. وفى كلا الحالتين تكون الخطوة الأولى عمل إرتباط بين البروتين المنظم وبين جزيئ دنا تحت الدراسة. ولذلك عند إستخلاص البروتين المنظم لن يكون فى صورة نقية ولذلك تكون نقطة البداية فى العمل هو أن يكون

المستخلص أى البروتين النووى غير متميز أى غير المجزأ unfractioned إلى بروتين دنا (يلاحظ أن تنظيم الجين يحدث فى النواة).

أ - بطء هجرة معقد دنا بروتين:

Gel retardation of DNA- protein complexes

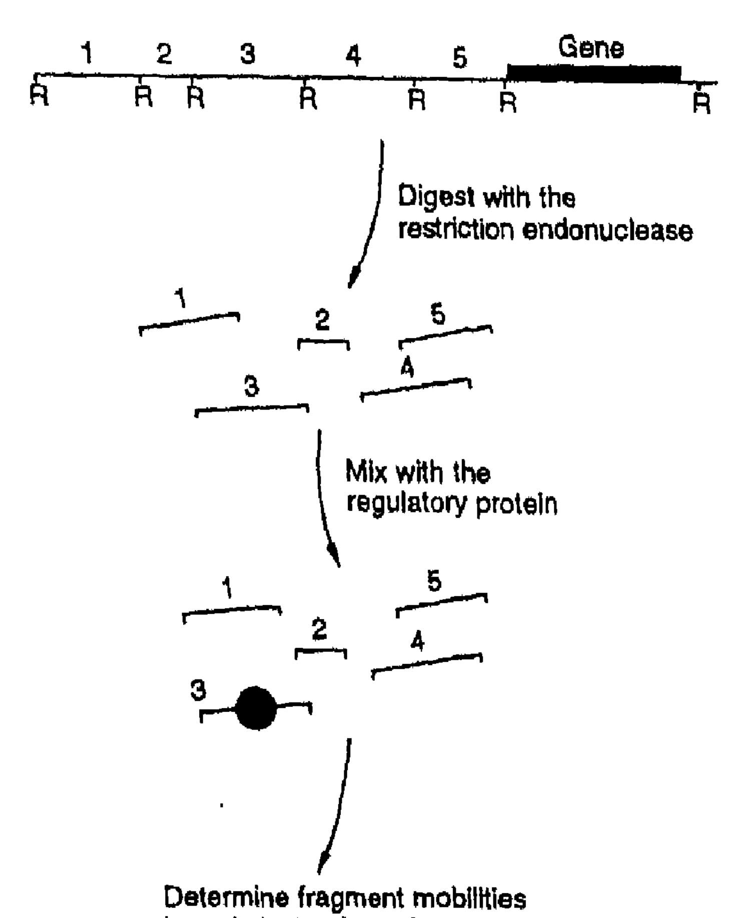
عند إلتصاق دنا مع البروتين ينتج عن ذلك جزيئ معقد وزنه كبير ويمكن التعرف على ذلك بواسطة فصل الهجرة الكهربائى حيث سيكون المركب المعقد بطيئ الهجرة. تسمى هذه الطريقة التأخير فى الجل gel retardation. يمكن بهذه الطريقة تحديد مكان إتصال البروتين المنظم بجزيئ دنا فى موقع تتابع التنظيم (شكل ١٠٥).



شكل ١٠٥ : بروتين مرتبط مقيد bound protein سيقلل من سرعة هجرة شـــظية دنا أثناء الهجرة فى وسط غروى فى مجال كهربائى

أى يمكن تحديد موقع تتابع التنظيم. ولعمل ذلك لابد أولا من تجزيئ دنا الذى يحتوى جزء منه على موقع تتابع التنظيم بواسطة إنزيم القطع r. e. قبل خلطة بالبروتين المنظم. ثم يتم خلط الأجزاء الناتجة بالبروتين المنظم (شكل ١٠٦) ثم عمل عملية فصل الهجرة الكهربائى والجزء الذى يبطء فى هجرته عن المعتاد هو الملتصق بالبروتين المنظم. وبذلك يمكن تحديد موقع تتابع التنظيم الذى يلتصق به

البروتين المنظم وذلك بإستخدام خريطة القطع restriction map. ولكن أحيانا تكون هذه الطريقة غير فعالة عندما يكون طول تتابع القواعد أقل من ١٠ زوج قاعدة bp ولذلك من النادر أن يحدث بطء فى الهجرة فى الجل. ولذلك نحتاج إلى طريقة أدق من هذه الطريقة لتحديد الموقع بالضبط الخاص بتتابع القواعد على شظية دنا والذى يلتصق بالبروتين المنظم.



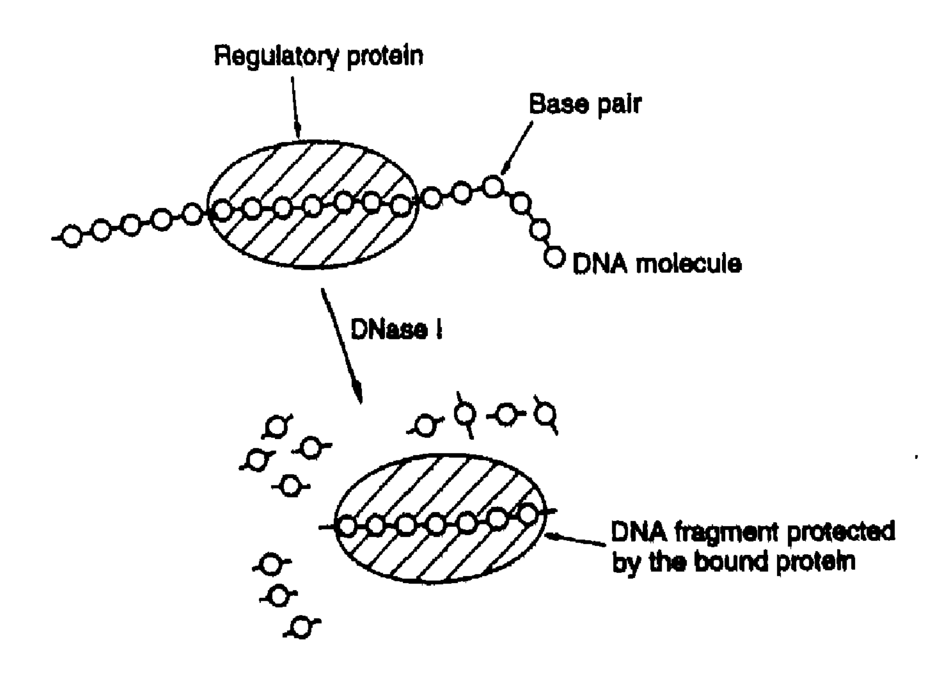
شكل ١٠٦: عمل تجربة gel retardation.

ب - بصمة القدم بواسطة إنزيم تحليل دنا رقم I:

Foot Printing with DNase I

تسمى الطريقة بصمة القدم foot printing وهى تستخدم أيضا طريقة التأخير فى الجل. وتعتمد هذه الطريقة على أن التفاعل مع البروتين المنظم يحمى منطقة تتابع القواعد فى جزيئ دنا من التحليل أى الهضم بواسطة إنزيم القطع r. e. مثل إنزيم

DNase I. أى أن إلتصاق البروتين المنظم مع منطقة تتابع القواعد سيحمى هذه المنطقة من نشاط الإنزيم. يمكن أن تستخدم هذه الظاهرة لتوضيح مكان إلتصاق البروتين المنظم مع موقع تتابع القواعد على جزيئ دنا (شكل ١٠٧).



شكل ١٠٧: بروتين مرتبط يحمى منطقة فى جزيئ دنا من التحليل بواسطة إنزيم نيوكلييز مثل DNase 1.

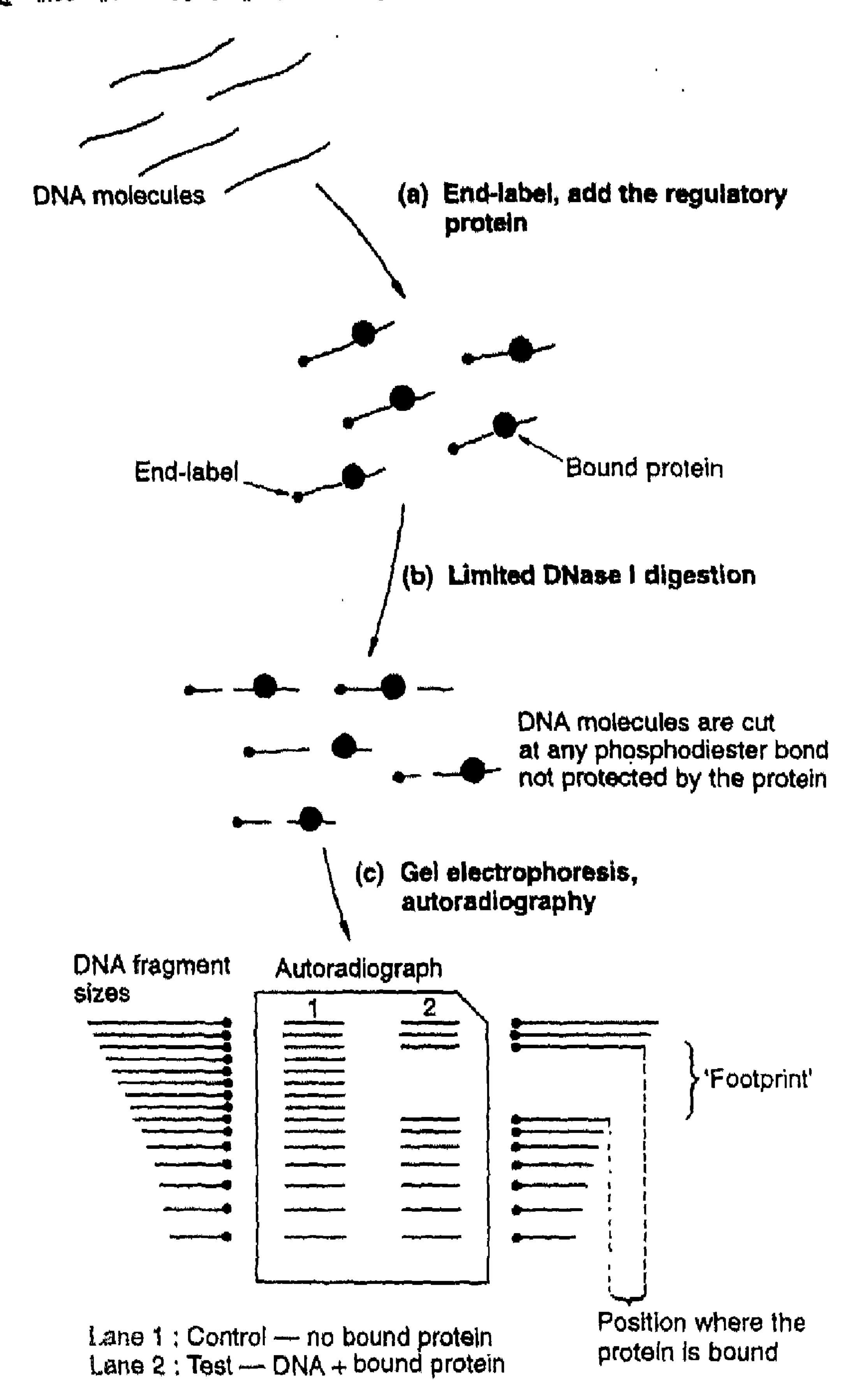
بداية هذه الطريقة (شكل ١٠٨) هى تعليم أحد طرفى جزيئ دنا بواسطة معلم مشع ثم يتم خلط مع بروتين منظم. ثم يضاف إنزيم DNase 1 ولكن بتركيز معين بحيث أن التحليل الكامل لشظية دنا لا يحدث أى يكون التحليل جزئى. وهكذا سيتم قطع أو تجزيئ جزيئ دنا عند أى ربطة من روابط فوسفور ثنائى الإستر phosphodiester غير محمية بالبروتين ثم يتم عمل فصل الهجرة الكهربائى فى غروى polyacrylamide. فى حالة عدم وجود إلتحام البروتين مع تتابع القواعد وذلك فى تجربة مقارنة خالية من البروتين المرتبط فإن ناتج الفصل هو تكوين عائلة من الشظايا المعلمة تختلف فى طولها فى نيوكليوتيد واحد ولذلك تظهر وكأنها سلم ladder متدرج من الحزم أى الشرائط المشعة أو ذلك عند التصوير بالتصوير

الأشعاعى الذاتى autoradiography. ولكن المناطق المحمية أى المغلقة بالبروتين تحمى روابط فوسفور ثنائى الإستر من القطع فى جزيئ دنا بواسطة الإنزيم، ولذلك فإن ترتيب الحزم فى الصورة لن يكون متدرج بل توجد فراغات gaps تدل على موقع وجود الشظايا المرتبط بها البروتين المنظم وهذا الفراغ يسمى بصمة القدم foot print. وهكذا يمكن تحديد موقع التنظيم فى جزيئ دنا من حجم الشظايا على كلا جانبى بصمة القدم أى تحديد طول الشظية عند بداية القطع وتحديد طول الشظية عند نهاية القطع وبذلك يمكن تحديد موقع تتابع التنظيم على جزيئ دنا وذلك بواسطة تحديد حجم الشظايا على جانبى أى طرفى بصمة القدم.

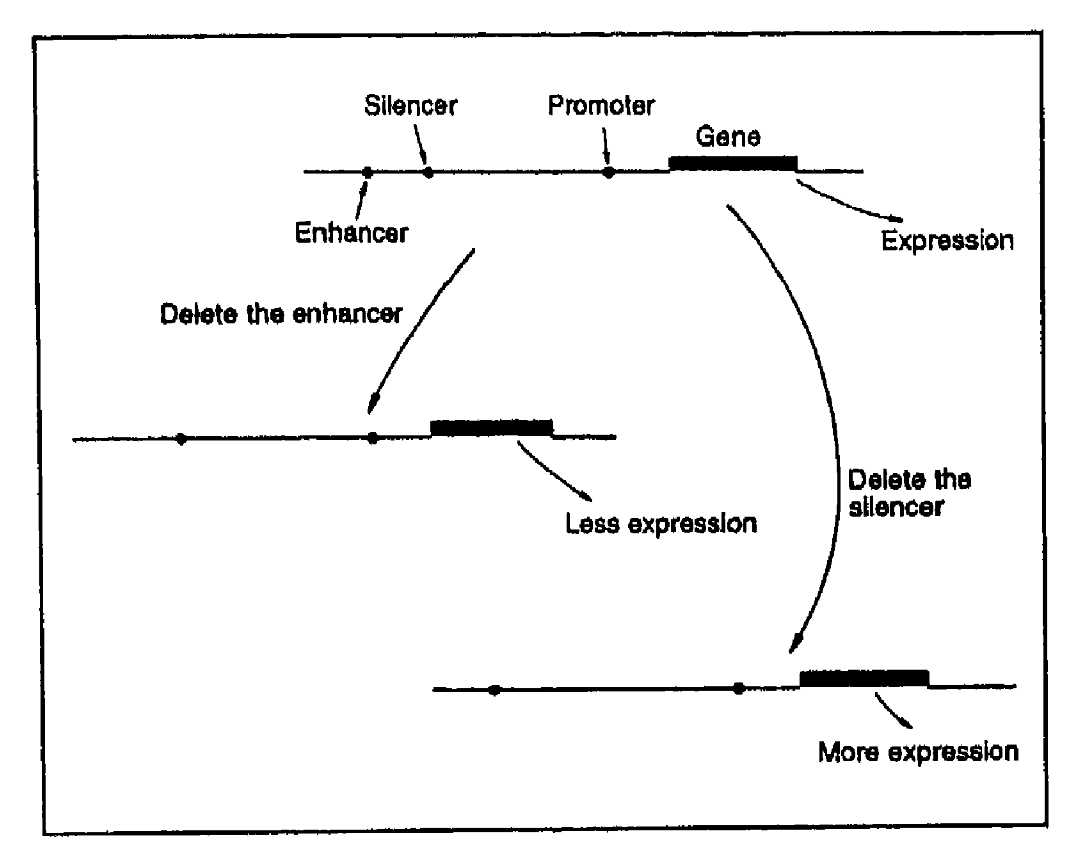
تحديد تتابع التنظيم بواسطة تحليل النقص

Identifying control sequences by deletion analysis

الطريقتين السابقتين التأخير فى الجل وبصمة القدم تحدد مكان تتابع التنظيم قبل بداية الجين الموطن ولكنها لا توضح وظيفة أو دور تتابع التنظيم هل هو مشجع enhancer أو مهدىء silencer أو منشط promoter. طريقة تحليل النقص deletion analysis مختلفة تماما عن الطريقتين السابقتين حيث أنها تحدد مكان تتابع التنظيم وعلاوة على ذلك توضح وظيفة كل واحد من تتابع تنظيم. يعتمد هذا الإختبار فى أن نقص موقع أحد تتابعات القواعد يسبب تغيير فى تعبير الجين عن نفسه ووظيفته. فعند نقص المشجع يحدث قلة فى تعبير الجين عن نفسه أى يحدث مثلا قلة أو ندرة عن المركب الذى ينتج عن هذا الجين (شكل ١٠٩) وعند حدوث العكس وهو نقص المهدىء فإنه يحدث زيادة فى تعبير الجين عن نفسه أى مثلا يزيد تركيز المركب الناتج عن هذا الجين.



شكل ١٠٨ : DNase foot printing.



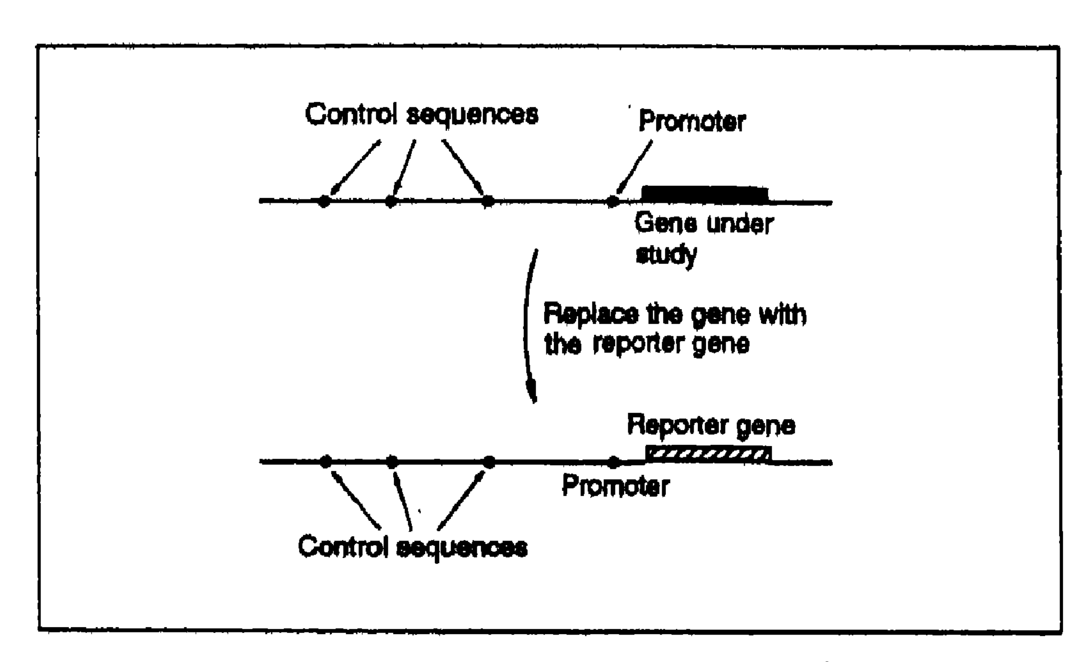
شكل ١٠٩ : فكرة تحليل النقص deletion analysis

أ – جينات المراسلة Reporter genes:

قبل القيام بعمل إختبار تحليل النقص يجب أن يوجد طريقة لتقدير assay تأثير نقص تتابع التنظيم على تعبير الجين الموطن عن نفسه، يحدث ذلك التأثير عادة عندما يكون الجين الموطن لنفس الكائن الحى الخاص به ويكون مؤثر ولكن قد يكون ذلك غير ممكن وسيكون التأثير ضعيف أو غير موجود إطلاقا عندما يكون الجين الموطن من نبات زهرى وتم توطينه فى البكتريا إ. كولاى مثلا.

ولكن يمكن تلافى ذلك الآن حيث أنه الآن تم تطوير الناقلات الوسيطة cloning vectors بحيث أنه يمكن عمل توطين للجين المطلوب فى نفس الكائن الحى وأصبح ذلك ممكن. وهذه كانت أول مشكلة وتم حلها. ولكن المشكلة الثانية أن الجين المطلوب توطينه له نسخة مماثلة تماما فى الكائن الحى فسيحدث صعوبة فى التمييز بين تعبير الجين الموطن وتعبير الجين الأصلى حيث لا يمكن معرفة أيهما المؤثر

فكلاهما ينتج نفس المركب فهل الجين الأصلى هو الذى ينتج المركب أو الجين الموطن هو المنتج للمركب. فى هذه الحالة يتم إستخدام جين المراسلة reporter gene. يعتبر جين المراسلة هو الجين الذى يتم إلتحامه مع المنطقة التى قبل بداية الجين تحت الدراسة upstream region وحيث يحل محل الجين الموطن الأصلى (شكل ١١٠). عند توطين جين المراسلة فى الكائن العائل فإن نظام التعبير الخاص بجين المراسلة سيحاكى تماما exactly mimic الجين الأصلى حيث أن جين المراسلة سيكون تحت تأثير نفس تتابع التنظيم control sequences الخاص بالجين الأصلى وهذا التتابع يتحكم فى جين المراسلة كما يتحكم تماما فى الجين الأصلى.



شكل ١١٠: جين المراسلة a reporter gene

يجب إختبار جين المراسلة بعناية وشروط وأول شرط أن جين المراسلة يجب أن يشفر لصفة ظاهرة phenotype أى تظهر بسهولة على الشكل الظاهرى وأن هذه الصفة لاتظهر أصلا فى الكائن العائل. ثان شرط أنه يتم الكشف عن هذه الصفة الظاهرية بسهولة بعد توطين جين المراسلة فى العائل. ثالث شرط يمكن تقدير هذه الصفة كميا. يمكن أن تتوافر هذه الشروط فى عديد من جينات المراسلة كما فى الجدول (جدول ٦).

جميع هذه الجينات تم الحصول عليها من البكتريا إ. كولاى عدا *lux* حيث يمكن الحصول عليها من ثلاثة مصادر وهى البكتريا المضيئة أى المشعة **luminescent** مثل *Vibrio harveyii*، *V. fischeri* وأيضا ذبابة النار **firefly** أو يمكن أن تسمى الذبابة النارية *Photinus Pyralis*.

ب - عمل طريقة تحليل النقص Carrying out a deletion analysis:

عند إختيار جين المراسلة المناسب وتم عمل المطلوب ونقل الجين فإن طريقة تحليل النقص يمكن عملها. يمكن عمل نقص لجزء من دنا قبل بداية الجين **upstream** أى فى منطقة قبل بداية الجين ويمكن عمل ذلك بطرق عديدة ومنها الطريقة الآتية (شكل ١١١).

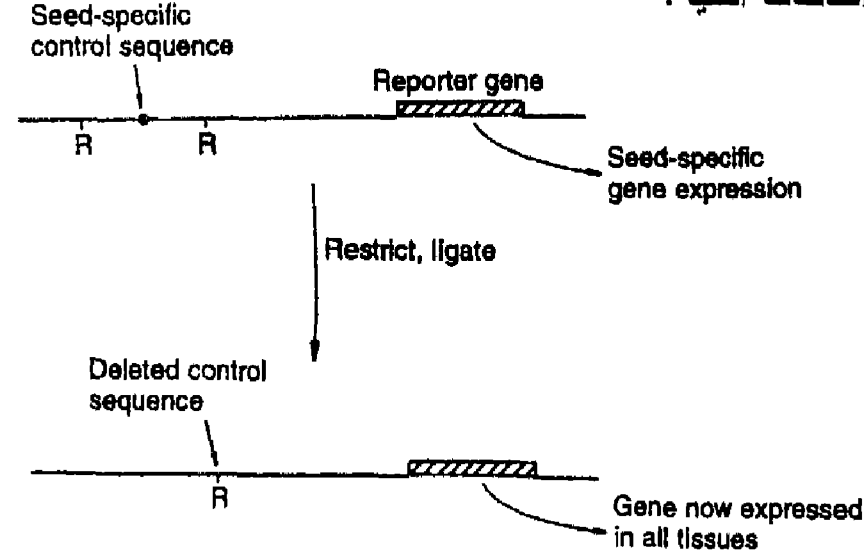
جدول ٦: بعض جينات المراسلة المستخدمة فى تنظيم الجين فى الكائنات الراقية.

الجين	ناتج الجين	طريقة التقدير كميا
lacZ	β-Galactosidase	Histochemical test
neo	Neomycin phosphotransferase	Kanamycin resistance
cat	Chloramphenicol acetyltransferase	Chloramphenicol resistance
dhfr	Dihydrofolate reductase	Methotrexate resistance
ophIV	Hygromycin phosphotransferase	Hygromycin resistance
lux	Luciferase	Bioluminescence
uidA	β-Glucuronidase	Histochemical test

يمكن تقدير تأثير النقص فى دنا وذلك بإدخال الجزيئ الناقص أى التركيب الناقص **deleted construct** فى الكائن العائل ثم تقدير نظام وكمية تعسر جين المراسلة **pattern and extent of expression of the reporter gene**.

حيث تزداد درجة أو كمية التعبير وذلك إذا كان الجزء المزال أى الناقص هو تتابع المهدىء وتقل كمية أو درجة التعبير إذا كان الجزء المزال هو المنشط **promoter** أو المشجع **enhancer**. أو حالة أخرى وهى تغيير تخصص الأنسجة

tissue- specificity (شكل ١١١) حيث بعد أن كان تأثير الجين خاص على أنسجة البذرة فقط فإنه بعد عملية الإزالة أى النقص يصبح تأثير الجين على جميع أنسجة النبات ومن هنا يمكن بدقة شديدة تحديد تتابع التنظيم الذى يتحكم فى إستجابة الأنسجة a tissue- responsive control sequence. يجب ترجمة نتائج تحليل النقص بحذر ودقة وعناية، حيث أنه يمكن أن تنشأ أخطاء لو أن الإزالة المفردة تزيل أكثر من تتابع فقد تزيل تتابعين ملتصقين ببعضهما أو متقاربين بدرجة كبيرة وهذا ما يحدث كثيراً، أو إزالة أثنين من التتابعات يمكن أن يتعاونا لينتجا تأثير واحد produce a single response. بالرغم من الصعوبات هذه فى تحليل النقص فإن طريقة تحليل النقص مع دراسة مناطق إلتحام البروتين protein- binding sites تعتبر هامة ومعلومة هامة عن كيفية تعبير الجينات عن نفسها وكيف يتم تنظيم ذلك التعبير وبالإضافة إلى ذلك أعطت دليل ومعلومات هامة عن تحليلات وراثية للتشكل والنمو فى الكائنات الحية.



شكل ١١١ : تحليل النقص deletion analysis. جين مراسلة a reporter gene تم لصقه مع المنطقة upstream لجين خاص بالبذرة فى نبات seed- specific gene from a plant. إزالة جزء وهو شظية التحديد restriction fragment والمحدودة بالموقعين R يسبب نقص أى إزالة تتابع التنظيم والذى يكون عامل وسيط فى تعبير الجين الخاص بالبذرة mediates seed- specific gene expression وهكذا ولذلك فإن جين المراسلة يعبر عن نفسه فى جميع أنسجة النبات وليست فى أنسجة البذرة فقط.

تعريف ودراسة ناتج ترجمة الجين الموطن

Identifying and Studying the Translation Product of a Cloned Gene.

أصبح توطين الجين مهم فى دراسة الجين وأيضا تركيب البروتين الناتج. الدراسات على تركيب البروتين ووظيفته أمكن التعرف عليها بدقة فى الوقت الحديث وذلك بإستخدام طرق حديثة لعمل طفرات في الجين الموطن وهكذا يمكن عمل التغييرات فى تركيب البروتين المشفر ودراسته بذلك.

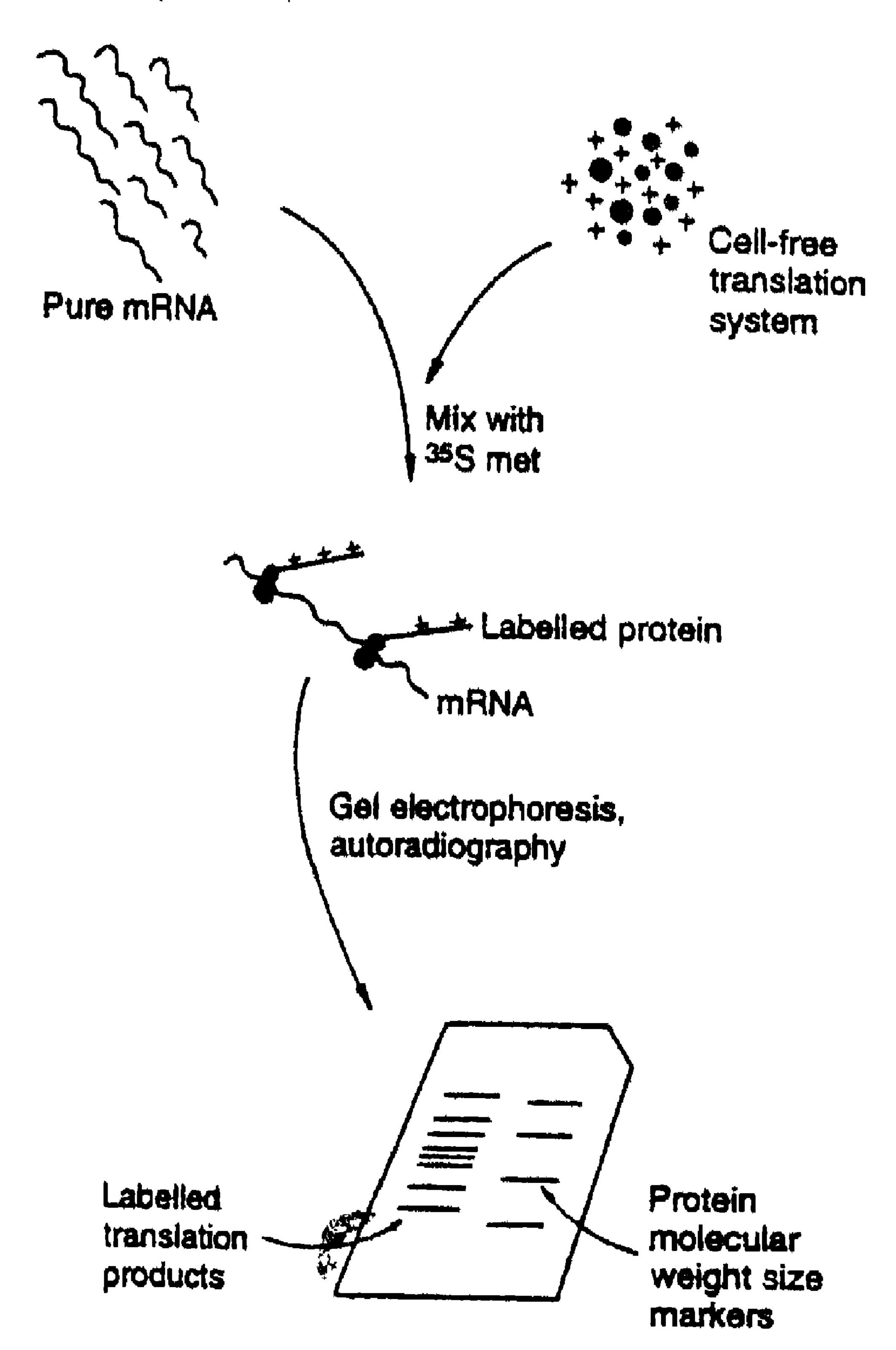
وقبل دراسة ذلك يجب التعرف على كيفية تعريف وعلاقة البروتين المشفر بجين موطن معين. أحيانا لا نحتاج ذلك حيث أن تركيب البروتين معروف فى كثير من الأحيان وحتى قبل تجارب توطين الجين. ولكن أحيانا نحتاج ذلك حيث أن الناتج البروتينى للجين الموطن لم يتم التعرف عليه وعليه فى هذه الحالة نحتاج طريقة لعزل البروتين الخاص بالجين الموطن.

أ - طريقتى ترجمة تحرير الجين HRT وترجمة تقييد الجلين HART للتطرف على ناتج ترجمة الجين الموطن:

HRT and HART can identify the translation product of a cloned gene

توجد طريقتين متشابهتين نسبيا وهما طريقة ترجمة تحرير الجين **hybrid release translation (HRT)** وطريقة ترجمة تقييد الجين أى طريقة ترجمة الجين المقيد أى ترجمة خلب الجين **hybrid-arrest translation (HART)** تستعملان للتعرف على ناتج الترجمة المشفر بالجين الموطن. تعتمد كلا الطريقتين على قدرة رنا رسول بعد تنقيته على توجيه تخليق البروتين فى خليط صناعى من المركبات بعيدا عن الخلية النباتية أى لا يستعمل فيه خلايا نباتية على الإطلاق **cell free translation system**. هذه المستخلصات من الخلايا عادة يتم تحضيرها من حبوب القمح المستنبتة أو من خلايا معينة **reticulocyte** فى الأرانب (هذه الخلايا فى القمح

أو الأرانب نشطة فى تخليق البروتين بدرجة كبيرة جدا) وهى تحتوى ريبوسومات ورنا ناقل والجزيئات الأخرى اللازمة لتخليق البروتين. (شكل ١١٢).

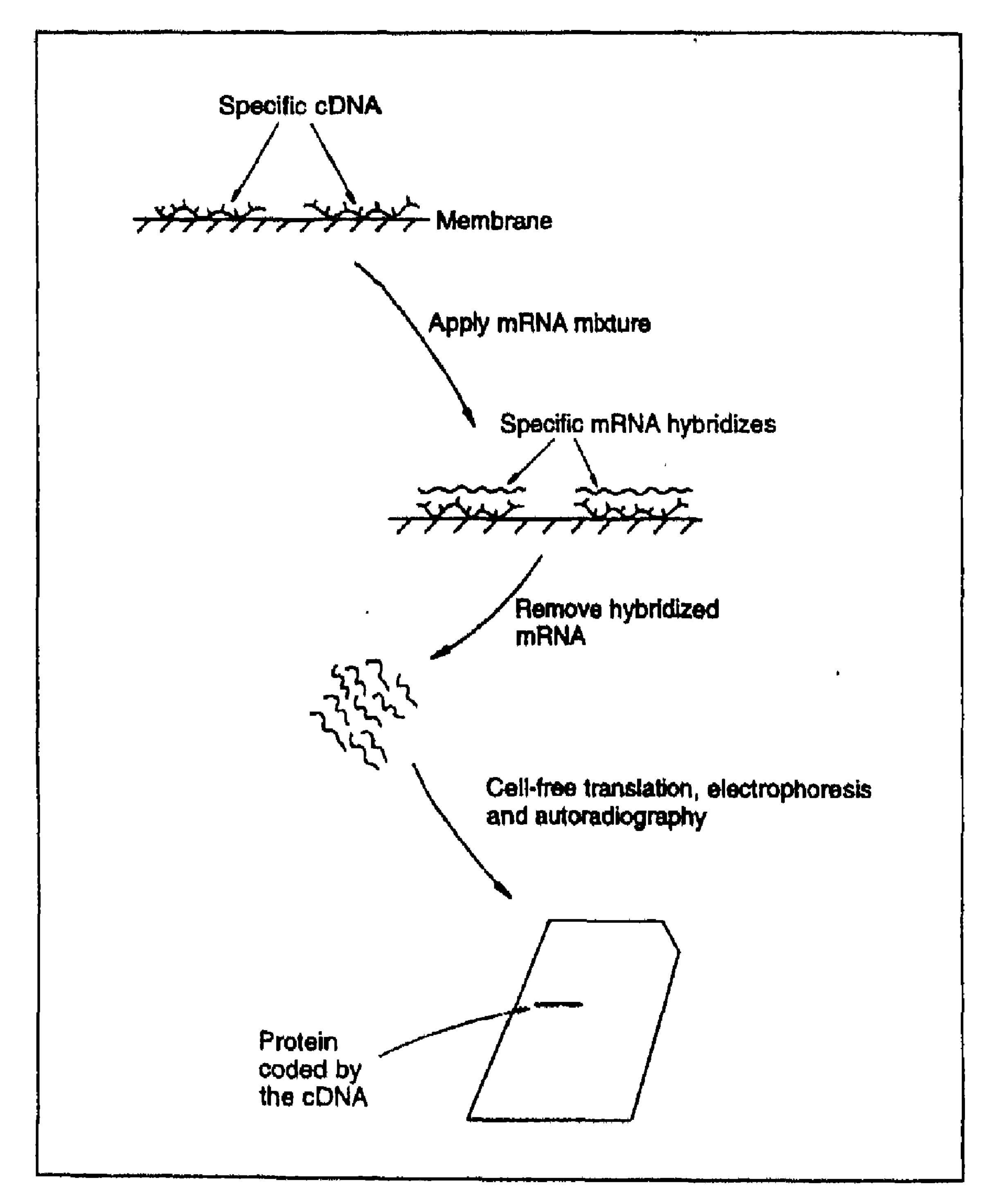


شكل ١١٢ : الترجمة فى عدم وجود (غياب) الخلايا Cell-free translation.

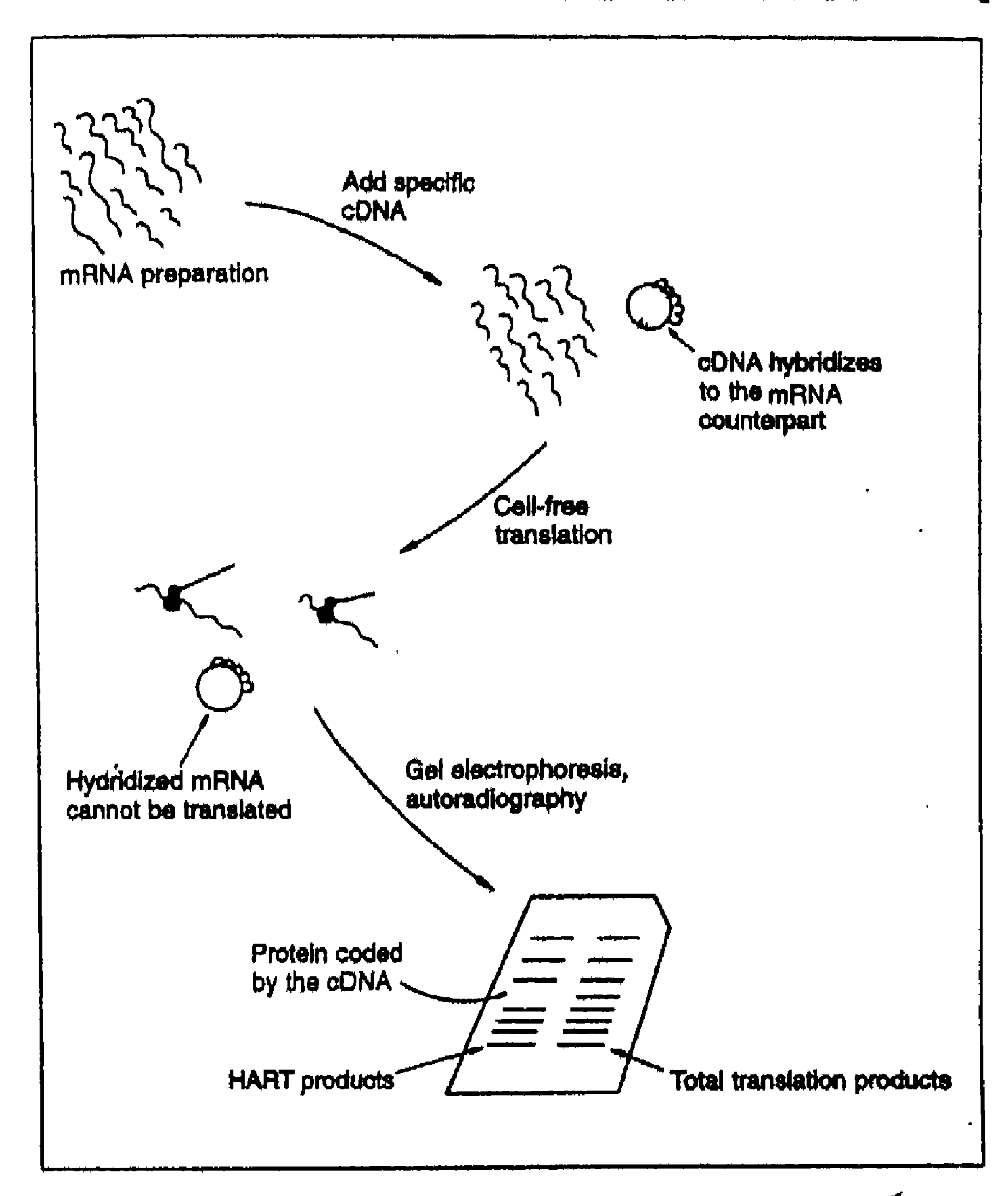
تضاف عينة رنا رسول إلى جهاز الترجمة الخال من الخلايا cell free translation system مع خليط من عشرون حامض أمينى موجود فى البروتين وأحدهما معلم مشع، وعادة يكون المثيونين وهو ميثيونين ذو الكبريت المشع ٣٥ أى كب٣٥. بذلك يتم ترجمة جزيئات رنا رسول إلى مخلوط من البروتينات المشعة (شكل ١١٢) أى يتكون مخلوط من البروتينات المشعة، وهذه يمكن فصلها بواسطة فصل الهجرة الكهربائية ويتم تصويرها بالتصوير الأشعاعى الذاتى. كل شريط أو حزمة تمثل بروتين واحد فقط مشفر بواسطة أحد جزيئات رنا رسول الموجود فى العينة.

يمكن عمل هاتين الطريقتين HRT، HART بكفاءة عالية عندما يمكن تحضير دنا التكميلى للكلون c DNA clone والمجهز مباشرة من عينة رنا رسول. فى حالة إختبار HRT يتم دنترة دنا التكميلى وإلتصاقه على غشاء نيلون أو نيتروسيلليلوز ثم يتم تحضينه مع عينة رنا رسول (شكل ١١٣). يعتبر رنا رسول المناظر لدنا التكميلى متوافق عندما يتم التهجين بين هذا الرنا رسول ودنا التكميلى وهما ملتصقين بالغشاء. بعد إزالة الجزيئات الغير مرتبطة فإن رسول المهجن يتم تحرره ويصبح مستقل ويتم ترجمته فى المخلوط السابق الخال من الخلايا. وهكذا تنتج عينة نقية من البروتين مشفرة بواسطة دنا تكميلى أى ناتجة بواسطة دنا تكميلى.

تعتبر طريقة HART مختلفة قليلا حيث يضاف دنا التكميلى المدنترمباشرة إلى عينة رنا رسول (شكل ١١٤). يحدث التهجين بين دنا تكميلى ونظيره رنا رسول ولكن غى هذه الحالة رنا رسول الحر الغير مرتبط لا يستبعد وبدلا من ذلك فإن العينة جميعها يتم ترجمتها في نظام المخلوط الخال من الخلايا cell- free system. رنا رسول المهجن يكون غير قادر على عمل ترجمة ولذلك فإ جميع البروتينات عدا البروتين المشفر بواسطة الجين الموطن يتم تخليقها. ولذلك فإن ناتج ترجمة الجين الموطن أى البروتين الخاص بالجين الموطن يكون غير موجود فى صورة التصوير الإشعاعى الذاتى، وهكذا يمكن التعرف على موقعه وترتيبه.



شكل ١١٣ : ترجمة تقييد الجين Hybrid-arrest translation HART.



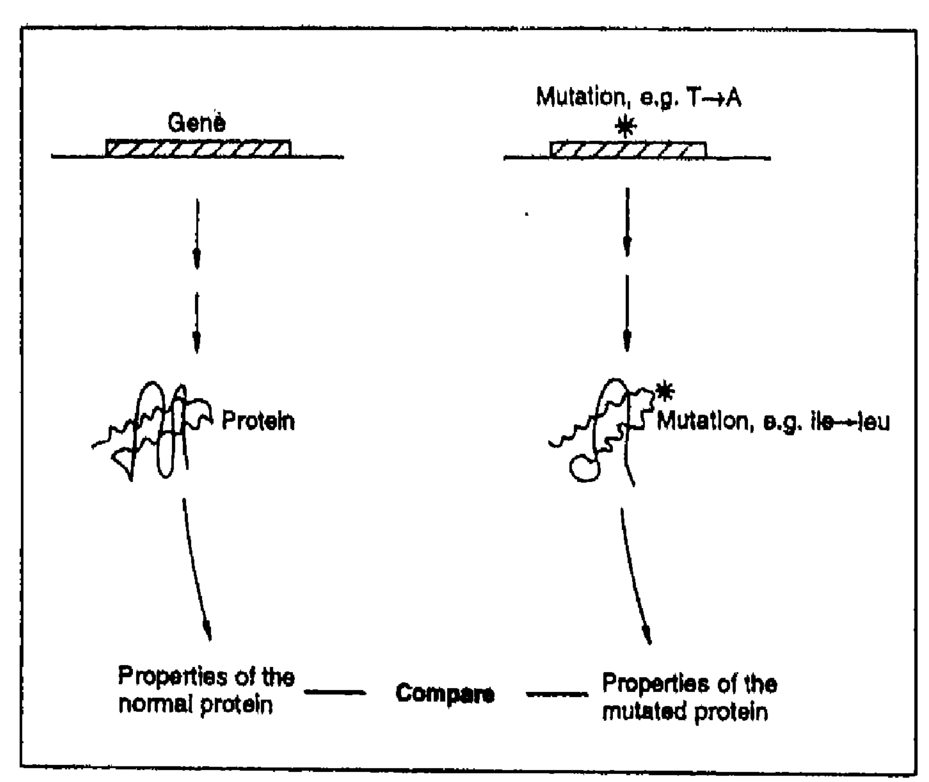
شكل ١١٤ : ترجمة تقييد الجين Hybrid-arrest translation HART.

ب - طرق تحليل البروتين الناتج بواسطة التطفير الخال من الأنسجة الحية :

Analysis of proteins by *in vitro* mutagensis

بالرغم من أن HRT، HART يمكن بهما تعريف المركب الناتج عن النسخ للجين الموطن فإن هاتين الطريقتين يمكن بهما تعريف المركب الناتج عن الجين الموطن ولكن لا توضح تركيب البروتين نفسه بدقة. يوجد سؤال هام بين علماء البيولوجيا

الجزيئية وهو ما هو العلاقة بين تركيب البروتين وآلية نشاطه. أفضل طريقة لحل هذه المشكلة هى إنتاج طفرات فى الجين المشفر للبروتين ثم تقدير دور التغيير فى تتابع الأحماض الأمينية وعلاقته وخواصه بناتج الترجمة أى بالبروتين الناتج (شكل ١١٥).



شكل ١١٥: قد تغير الطفرة من ترتيب الأحماض الأمينية فى البروتين، وهكذا تــؤثر على خواصه

على أى حال تحدث الطفرات تلقائيا وعشوائيا فى الظروف الطبيعية بأعداد كبيرة نسبيا وخاصة فى الكائنات الحية الدقيقة. يمكن عمل طفرات بدون الأنسجة الحيـــة *in vitro* mutagenesis وهى طريقة يمكن بها التحكم فى تخليق طفرة معينة أى عمل طفرة فى موقع جين موطن معين، يمكن تلخيص ما سبق فيما يلى:-

١- طرق عديدة للتطفير الخال من الأنسجة:

Different types of *in vitro* mutagenesis techniques

توجد طرق عديدة لعمل طفرات فى الجين الموطن وفيما يلى أبسط هذه الطرق (شكل ١١٦):

أ – تقصير شظية قطع restriction fragment. أى تقصير جزء من الجين على جزيئ دنا أى إزالة جزء من الجين.

ب – يمكن فتح الجين the gene can be opened أى شقه أى كسره فى مكان قطع فريد مميز unique restriction site. ثم يتم إزالة عدد قليل من النيوكليوتيدات بواسطة إنزيم قطع داخلى متخصص لقطع جزيئ دنا ثنائى الحلزون مثل Ba 131 ثم إعادة لصق الجين.

جـ – يمكن إدخال جزيئ قصير من قليل النيوكلوتيدات a short oligonucleotides فى مكان القطع. تتابع القواعد فى قليل النيوكليوتيدات القصير يكون معروف ويتحكم فى تكوين وإضافة زيادة من الأحماض الأمينية والتى تدخل فى تركيب البروتين والتى ينتج عنها تكوين جزيئ جديد التركيب من البروتين والتى ينتج عنها تكوين جزيئ جديد التركيب من البروتين مثل ألفا هيلكس α helix أو يسبب تغيير وعدم ثبات فى تركيب البروتين. وعامة هذه الطريقة oligonucleotids- directed mutagenesis طريقة فعالة مرنة versatile technique والتى بها يمكن إدخال طفرة فى أى موقع من الجين.

٢ – إستخدام قليل النيوكليوتيدات لعمل طفرة نقطية فى الجين الموطن:

Using an oligonucleotides to introduce a point mutation in a cloned gene

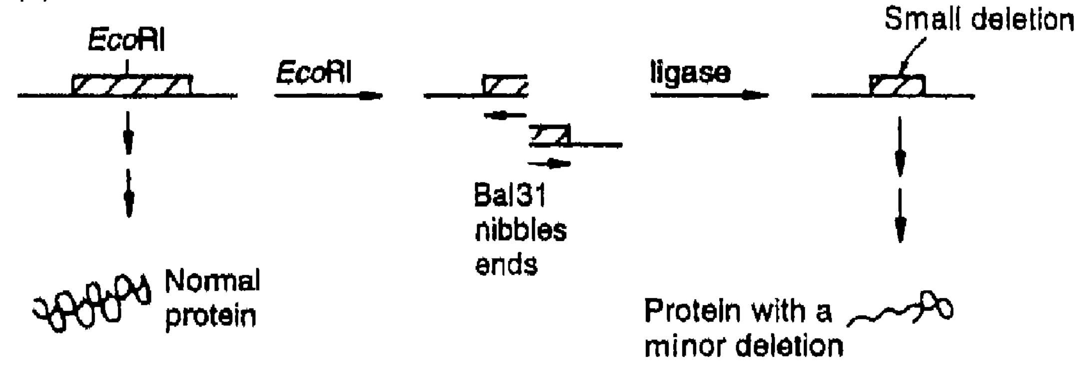
تحتاج هذه الطريقة (شكل ١١٧) إلى جين يمكن الحصول منه على حلزون دنا مفرد ثم يتم تعبئته فى الناقل الوسيط M13. ولذلك يتم تنقية دنا وحيد الحلزون ثم يتم التعرف على تركيب المنطقة التى سيتم تطفيرها بواسطة طريقة تتابع القواعد لدنا. ويتبع ذلك أى بعد ذلك يتم تخليق جزء من قليل النيوكليوتيدات ويكون مكمل للمنطقة المطلوب دراستها من الجين ويكون أيا محتوى على التغييرات المطلوب عملها أى الطفرة أى يكون مختلف نوعا فى تركيبه فى نيوكليوتيده واحده. ولكن بالرغم من هذا الإختلاف mismatch فإن هذا الجزيئ قليل النيوكليوتيدات القصير سيحدث له

تزاوج أى إزدواج أى إرتباط anneal مع جزيئ دنا وحيد الحلزون للناقل الوسيط M13 وسيعمل فى نفس الوقت أيضا كبادئ primer لتخليق جزيئ أى خيط دنا تكميلى وذلك بإستخدام شظية كلينا و Klenow fragment لإنزيم بلمرة دنا رقم I. تتم إســتمرارية هذا التفاعل أى تخليق هذا الجزيئ حتى يتكون جزيئ جديد تماما كامل وهكذا يصــبح الجزيئ المعاد صياغته recombinant molecule ثنائى الحلزون وكامل تماما.

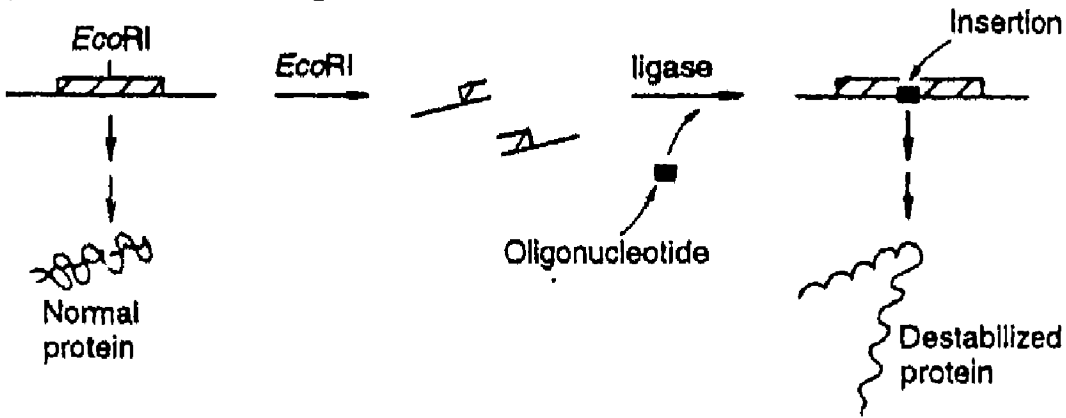
(a) Restriction fragment deletion

AluI AluI
Normal gene
AluI
ligase
AluI
Deleted gene
Normal protein
Protein with a major deletion

(b) Nucleotide removal at restriction site



(c) Insertion of an oligonucleotide



شكل ١١٦ : طرق مختلفة لعمل طفرات *in vitro* Various in vitro mutagenesis techniques.

بعد إدخال هذا الجزيئ بواسطة transfection لخلايا البكتريا إ. كولاى المعدة لذلك أى competent cells. يحدث تكاثر وتكرار لدنا ينتج عنه عديد من النسخ من دنا المعاد صياغته. طبيعة تكرار وتكاثر جزيئ دنا شبه المحافظة semiconservative nature of DNA replication تعنى أن نصف جزيئات دنا الثنائية الحلزون تكون غير متطفرة فى كلا الحلزونين بينما النصف الآخر من الجزيئات يكون متطفر فى كلا الحلزونين أى يحمل الطفرة. شبيه بذلك أيضا فإن نصف نسل الفاج الناتج سيحمل نسخ من جزيئات غير متطفرة وأن نصفها سيحمل الطفرات أى نسخ من جزيئات متطفرة. الفاج الناتج من خلايا سيتم تنميته على بيئة آجار ومسطح بكتيرى ولذلك ستنتج بليكات بدرجة أو transfected نسبة معينة. وحيث أن نصف البليكات plaques سيحتوى على الجزيئ المعاد صياغته الأصلى والنصف الآخر من البليكات سيحتوى على الجزيئ المتطفر أى المحتوى على الطفرة. يمكن التعرف على الجزيئات المطلوبة من البليكات وذلك بعمل تهجين يمكن التعرف على الجزيئات المطلوبة من البليكات وذلك بعمل تهجين للبليكات plaque hybridization وذلك بإستخدام قليل النيوكليوتيدات القصير المشع كمجس probe مع إستخدام ظروف شديدة الملائمة ولذلك فإن الهجين الناتج والذى فيه إزدواج القواعد تام تماما أى كامل وغير جزئى يكون هو الوحيد الثابت والمشع.

٣ - دراسة تأثير الطفرة Studying the effect of mutation:

الخلايا البكتيرية المصابة بالناقل الوسيط M13 لا تتحلل وتستمر فى الإنقسام. ولذلك فإن الجين الذى تم إدخاله فى الناقل الوسيط M13 يمكن أن يعبر عن نفسه وعن وظيفته فى خلية البكتريا وذلك بإنتاج بروتين معاد صياغته recombinant protein أى نوع محور من البروتين وليس البروتين الأصلى. ولذلك فإن البروتين المشفر بواسطة الجين الموطن يمكن أن يتم تنقيته من خلايا البكتريا المعاد صياغتها recombinant cells ويتم دراسة خواص هذا البروتين. ولذلك فإن تأثير طفرة فى

زوج واحد فقط من القواعد على نشاط البروتين وتركيبه يمكن معرفتهـا وتحديـدها ومعرفة تأثيرها وتقديرها can be assessed.

مدى أهمية طريقة التطفير الموجه بإستخدام قليل النيوكليوتيدات:

The Potential of oligonucleotide- directed mutagenesis

هذه الطريقة ومشابهاتها لها دور هام فى البحث الأكاديمى وفى التقنية الحيويـة التطبيقية. مثال ذلك أن الباحث يمكن أن يسأل أسئلة محددة عن كيفية تأثير تركيـب البروتين على الإنزيم.

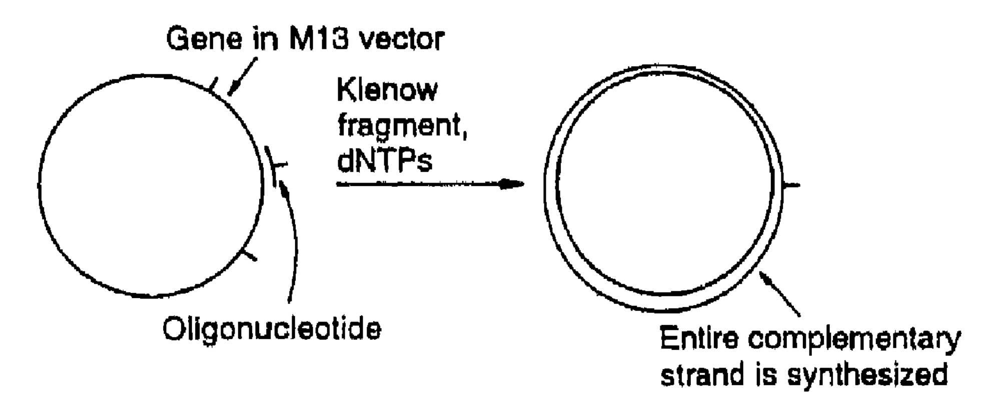
وذلك بتغيير قاعدة واحدة ومعرفة تأثيرها على البروتين أو الإنزيم. وهكذا يمكـن دراسة تأثير بروتين الإنزيم على نشاط الإنزيم وسرعة التفاعل بسهولة. وقد فتح ذلك الطريق إلى فرع جديد وهو هندسـة البروتينـات protein engineering وحيـث أن طريقة التطفير أى عمل الطفرات مستخدمة لتخليق إنزيمات جديدة تستخدم الأغراض التقنية الحيوية، ومثال ذلك التغيير الدقيق لتتابع الأحمـاض الأمينيـة فـى الإنـزيم subtilisin وحيث يستخدم هذا الإنزيم فى بـودرة الغسـيل البيولوجيـة biological washing. فإن تغيير تركيب هذا الإنزيم بالطريقة السابقة نتج عنهـا إنـزيم يقـاوم درجات الحرارة المرتفعة وأيضا التأثير الضار للمركبات التى تسبب أكسدة وتبييـض فى الغسالات.

(a) The oligonucleotide

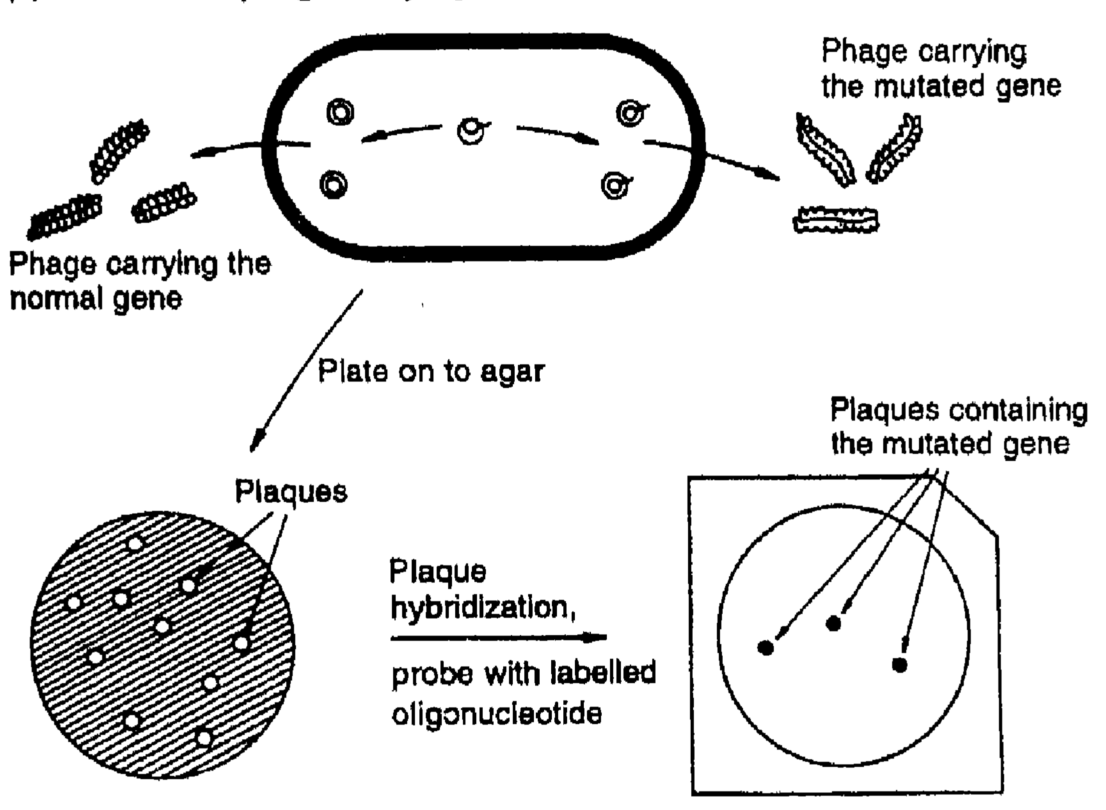
-------	gly	ala	asn	leu	met	--------	Normal gene sequence
--------	GGA	GCT	AAT	TTA	ATG	--------	
	• • •	• • •	• • •	• • •	• • •		
	CCT	CGA	ATA	AAT	TAC		Oligonucleotide
	gly	ala	tyr	leu	met		

Non-complementary mismatch

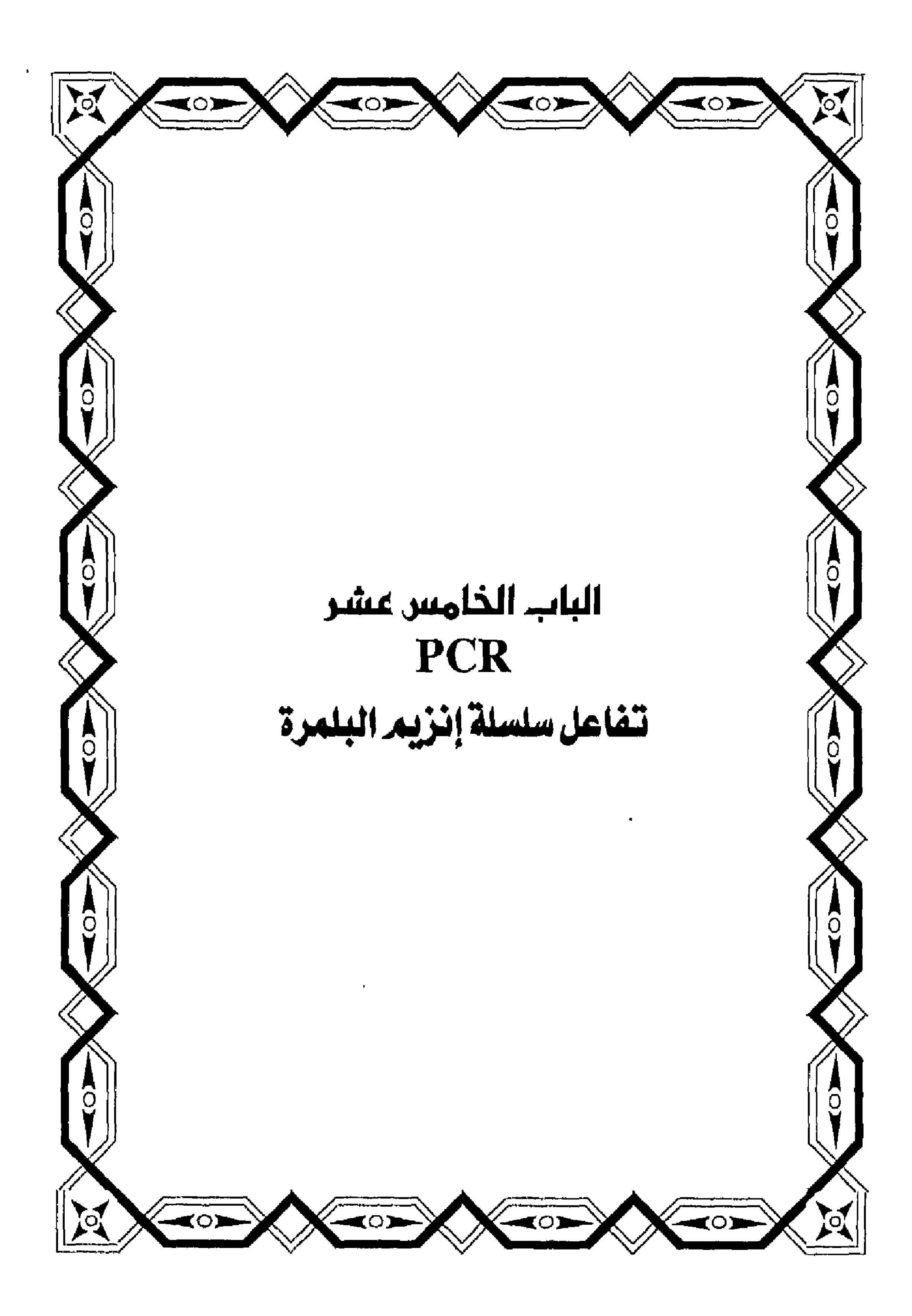
(b) Complementary strand synthesis



(c) Isolation of phage carrying the mutation



شكل ١١٧ : أحد طرق إحداث الطفرات بواسطة قليل النيوكليوتيدات القصير One method for oligonucleotide- directed mutagensis.



الباب الخامس عشر

PCR

تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة

الباب الخامس عشر
تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة
The Polymerase Chain Reaction (PCR)

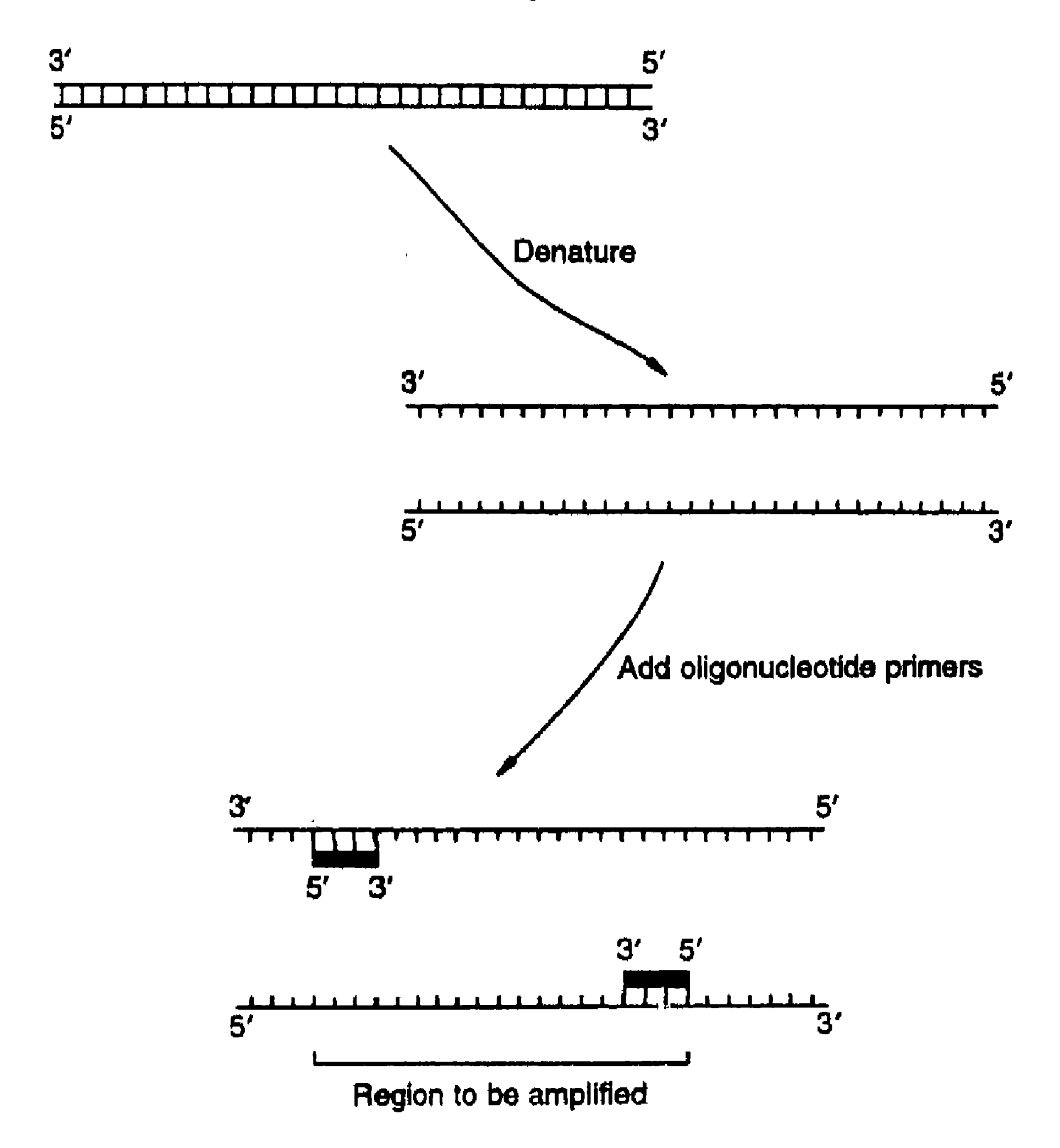
تم عمل وإكتشاف هذا التفاعل أى هذه الطريقة فى أواخر الثمانينيات. وهو عبارة عن طريقة سهلة وهى تتلخص فى أن جزء صغير أى منطقة صغيرة من جزيئ دنا ولتكن جين واحد مثلا ويتم نسخ هذه المنطقة أو الجين مررات عديدة بواسطة إنزيم بلمرة دنا. يتم الإحتياج إلى هذه الطريقة بشدة فى أبحاث الوراثة وعلوم البيولوجى والهندسة الوراثية كما أنها تستخدم فى الطب كثيرا.

ملخص لتفاعل سلسلة إنزيم البلمرة
The polymerase Chain Reaction Outline

نتيجة هذا التفاعل أى هذه الطريقة هو تكرار ونسخ جزء صغير من دنا فى أعداد كبيــرة، أى مثلا نسخ جين معين وعمل أعــداد هائلة منه. يمكن إختيار أى جزء من جــزيئ دنا وتكرارها ولكن لابد من معرفة تتابع القواعد فى المنطقة على حــدود borders هذا الجزء من دنا. لابد من معرفة تتابع القواعد بالتفصيل على منطقة الحدود للقيام بعمل طريقة PCR. ولذلك لابد من عمل تهجين لجزيئين قصيــرين من قليل النيوكليوتيدات لتكويــن جزء صغير من دنا ثنــائى الحلزون (شكل ١١٨)، أى عمل تهجين لهذا الجزء القصير من قليل النيوكليوتيدات مع حلزون دنا ويتم عمل ذلك لكلا الحلزونين من دنا. هذا الجزء القليل النيوكليوتيدات والذى يسمى بادىء primer يعمل كبادئ أى بداية لتخليق دنا سيحدد المنطقة التى سيتم تكبيرها.

يتم حدوث التكبير بواسطة إنزيم بلمرة رقم ١ ويسمى *Taq* polymerese I والمستخرج من البكتريا Thermus aquaticus وهى نفس البكتريا التى تنتج إنزيم القطع r. e. *Taq* I والذى يسمى *Taq* I restriction endonuclease. تعيش هذه

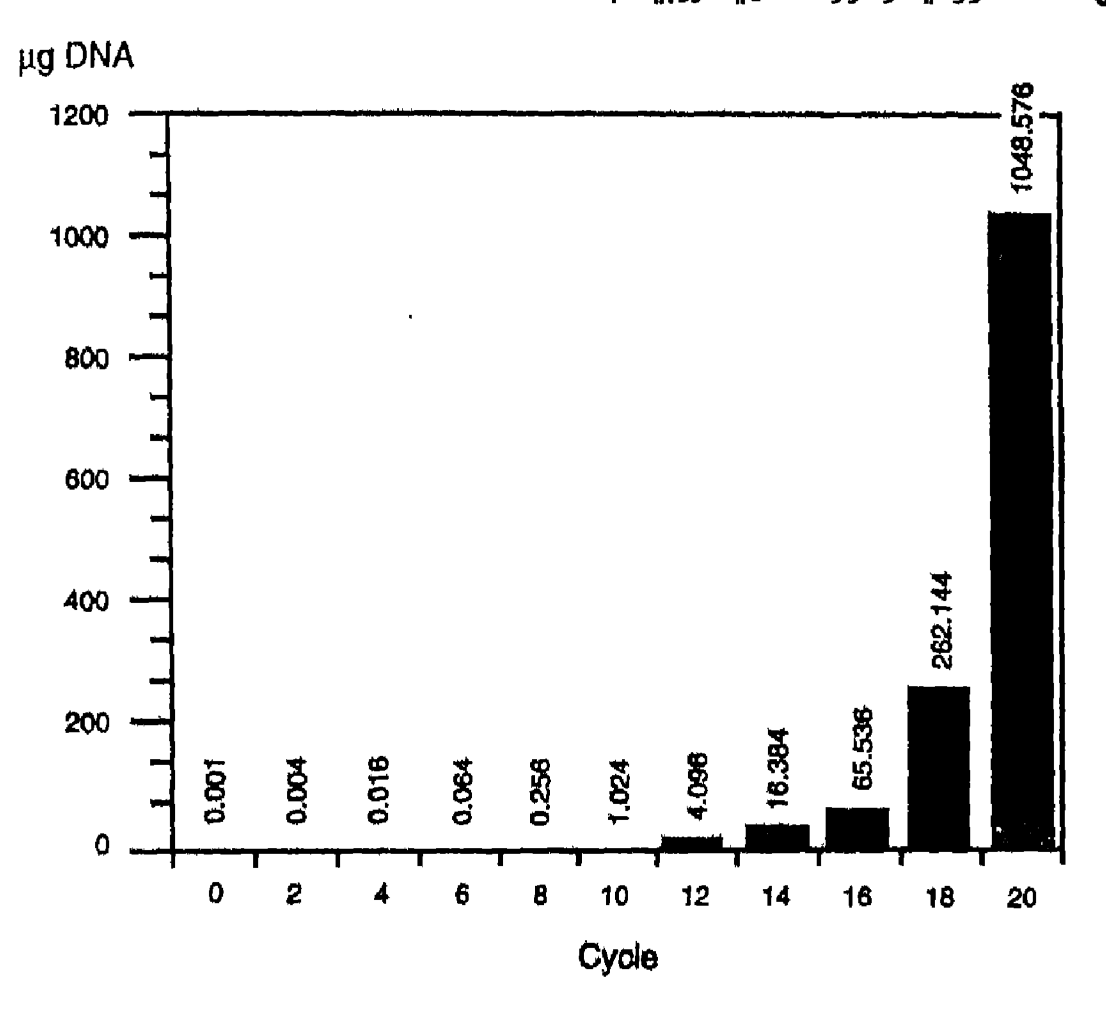
البكتريا فى الينابيع الحارة وكثير من إنزيماتها ومنها إنزيم بلمرة دنا رقم Taq I ثابتة فى درجة الحرارة العالية ويعنى ذلك أنها مقاومة للدنترة denaturation فى درجات الحرارة المرتفعة. ولذلك فإن صفة هامة لهذا الإنزيم أنه ثابت فى درجات الحرارة العالية وهذه الصفة هامة لهذه الطريقة أى أنه لابد من هذه الصفة لنجاح هذه الطريقة أى لابد من هذه الصفة لنجاح هذه الطريقة أى PCR.



شكل ١١٨: تهجين البادئات (قليلة النيوكليوتيدات oligonucleotids) مع جزيء دنا الأصلى template فى بداية طريقة PCR.

لبداية التكبير amplification بواسطة PCR، يضاف الإنزيم إلى دنا المطلوب تكبيره مضافا إليه ومرتبط معه البادىء primed template DNA ثم يتم تحضين هذا المخلوط وتكون النتيجة تخليق شريط أى حلزون دنا تكميلى جديد new complementary DNA وذلك لكل بادىء (شكل ١٢٠). يتم تسخين المخلوط بعد ذلك حتى درجة ٩٤ درجة مئوية ولذلك فإن الشريط أى الحلزون التكميلى الناتج يتم إنفصاله عن دنا الأصل ثم التبريد وبذلك يساعد عدد أكبر من البوادىء أو البادئات لأن تهجين من جديد دنا الأصل وفى مواقعها المناسبة والخاصة بها ويشمل ذلك أيضا مواقع على الحلزونات المختلقة حديثا newly synthesized. وحيث أن أنزيم بلمرة Taq I والذى يختلف عن الإنزيمات الأخرى فى أنه يتم تنشيطه بواسطة درجة الحرارة المرتفعة فإنه يقوم بالدورة الثانية من تخليق دنا أى الجيل الثانى من تخليق دنا. وهكذا تحت الدورة فى مرات عديدة متتابعة ولأعداد كبيرة جدا وتتلخص الدورة الواحدة فى أنها عملية دنترة denaturation ثم تهجين hybridization ثم تخليق synthesis. يتم تكرار هذه الدورة من ٢٥-٣٠ مرة وينتج عن ذلك تخليق عدة مئات الملايين من النسخ لشظايا دنا المطلوبة amplified DNA fragment (شكل ١١٩، ١٢٠) وهذا ما يقصد بالتكبير أى تكرارية العدد.

نهاية تفاعل PCR عبارة عن مخلوط تفاعل reaction nixture والذى يتم تحليله عادة بواسطة طريقة الهجرة فى وسط غروى فى مجال كهربائى ويستخدم الأجاروز كوسط غروى agarose gel electrophoresis- gel. ينتج عن هذه الطريقة فصل الجزء المكبر من دنا ونتيجة ذلك تظهر بكميات كافية جزيئات دنا المكبرة على هيئة حزمة أى شريط band فى الغروى أى فى الجل ويمكن التعرف عليها بعد صبغها بواسطة بروميد الأثيديم ethidium bromide (شكل ١٢٠). تعطى هذه الطريقة فكرة جيدة عن منطقة دنا المكبرة ومعلومات عنها كما سيتم شرحه فيما بعد فى هذا الفصل.



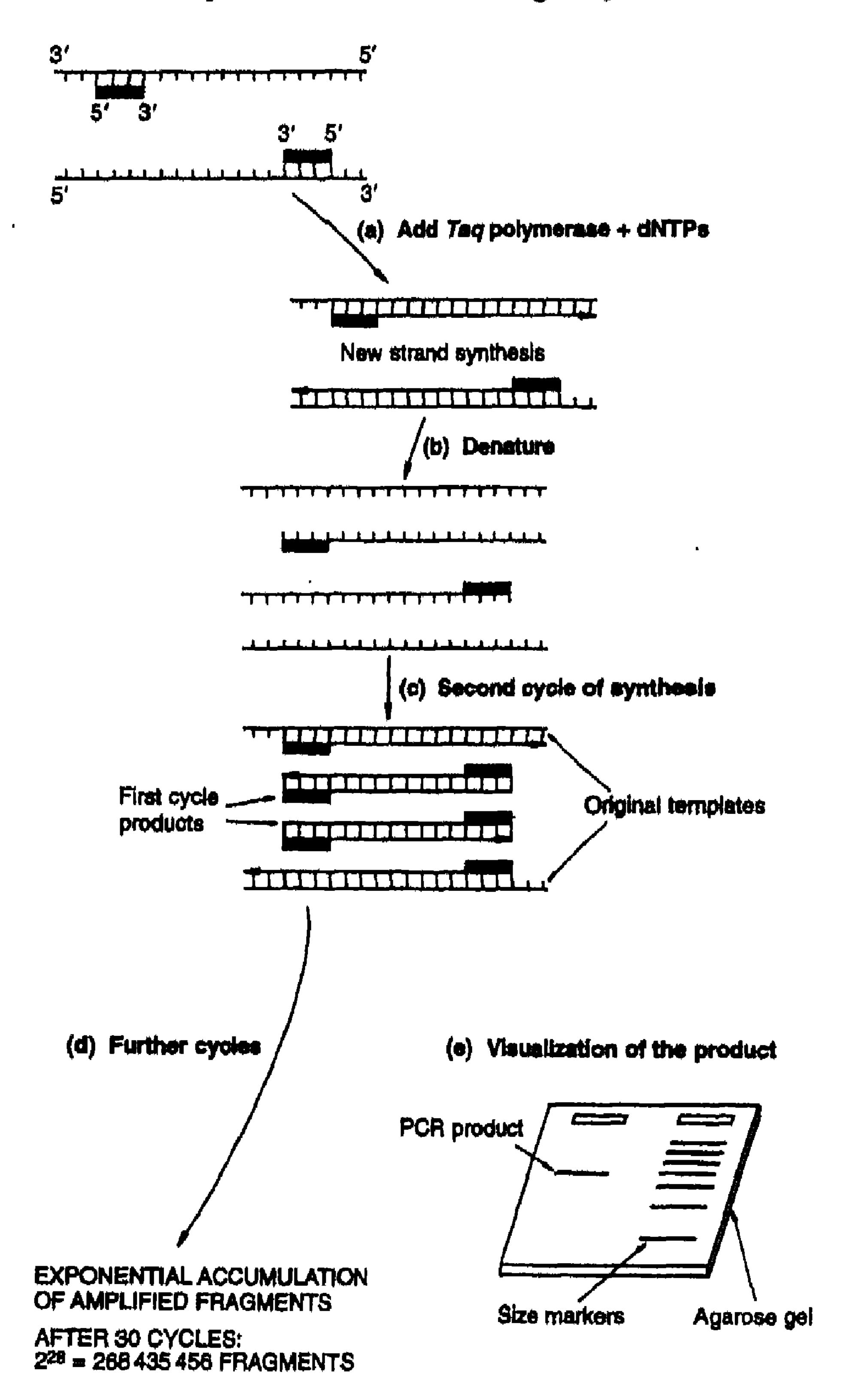
شكل ١١٩ : كمية دنا الناتجة مع كل دورة من دورات PCR.

كما يمكن إدخال ناتج هذه الطريقة أى منطقة دنا المكبرة أو الجين المكبر فى بلازميد أو فاج ثم يتم توطينه بالطرق العادية السابق ذكرها ويتم التعرف على وجود هذا الجين وفحصه بواسطة طرق قياسية مثل تتابع جزيئات أى قواعد دنا DNA sequencing.

شرح تفصيلى لتفاعل سلسلة إنزيم البلمرة
PCR In More Detail

تعتبر هذه الطريقة سهلة فى أدائها ولكن يجب أداء خطواتها بدقة وعناية وإلا تكون النتائج خاطئة. ومثال ذلك أنه لابد من توخى الدقة فى معرفة تتابع القواعد فى البادىء، حيث أن لذلك دور كبير فى نجاح الطريقة كما أن العناية والدقة فى درجات

الحرارة أثناء التسخين وأثناء التبريد فى أثناء الخطوات لها دور كبير فى إنجاز النتيجة المرجوة. وفيما يلى شرح هذه الطريقة بالتفصيل على خطوات كما سيلى:

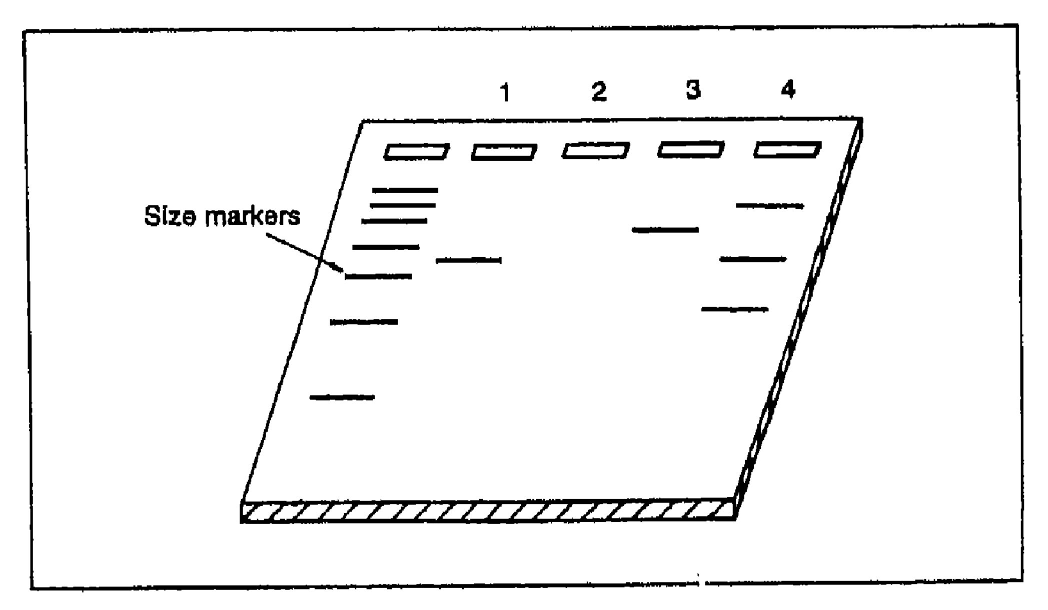


شكل ١٢٠ : تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة PCR.

١ - تصميم البادىء المناسب:

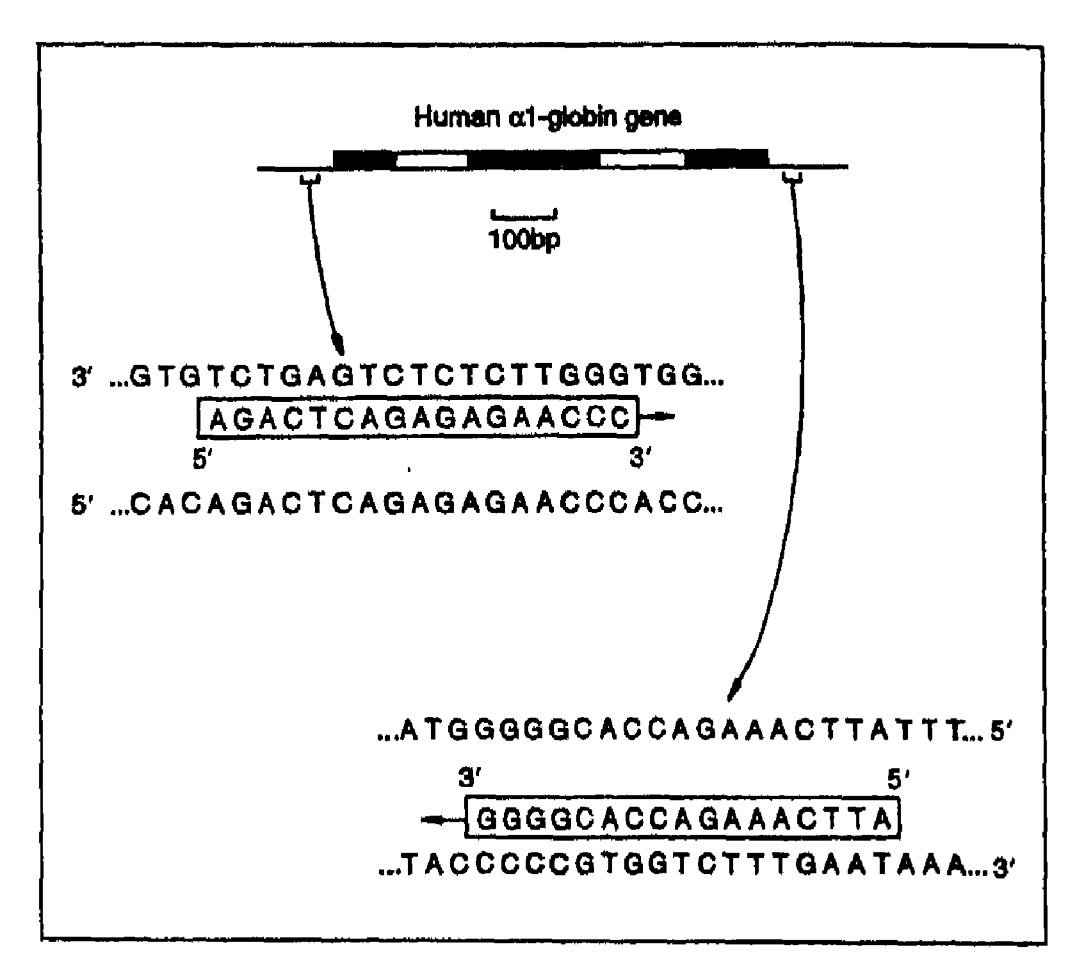
Designing the oligonucleotide primers a PCR

يعتبر البادىء هو مفتاح نجاح أو خطأ هذه الطريقة. عند تصميم البادىء بنجاح فإنه ينتج عن التجربة تكبير لشظية دنا المطلوبة من جزيئ دنا الأصلى. لو أن تصميم البادىء خاطىء فإنه إما أن لا يحدث تكبير أو يحدث تكبير لجزء غير مطلوب أو تكبير لأكثر من جزء ولذلك لابد من تصميم البادىء بعناية ودقة (شكل ١٢١).



شكل ١٢١: نتيجة PCR فى الحارة lane واحد شظية واحدة مكبرة مطلوبة نتيجة لأن البادىء مضبوط وصحيح. الحارة ٢ لا يوجد تكبير ويعنى ذلك أن واحد أو أثنين من البادئين غير قادرة على التهجين مع دنا الأصلى. الحارتين ٣, ٤ يكون التكبير نتيجة وجود بادئات غير صحيحة الحجم ويكون النتيجة تكوين خليط من النواتج المكبرة وهى الشظية المطلوبة وشظيتين آخرتين غير مطلوبتين ويكون نتيجة أن واحد من البادئات أو الأثنين يهجنان دنا الأصلى فى مواقع خاطئة غير مطلوبة.

تحضير البادىء المطلوب غير صعب بل أنه يجب أن يتوافق مع المنطقتين على حافتى الجين وليست مع الجين نفسه ولذلك يجب أن يكون البادىء متوافق مع الحواف وليس مماثل لها complementary not identical. لكى يحدث التهجين المطلوب مع المنطقتين الملاصقتين لحافتى الجين وأن الحواف '٣ للبادئين المهجنين يجب أن تواجه كل منها الأخرى (شكل ١٢٢).



شكل ١٢٢: زوج من البدئات يستخدم لتكبير جين ألفا ١ جلوبين الخاص بالإنسان Amplify the human –α1 globin gene الإكسونات الأجزاء الغامقة والإنترونـــات الأجزاء الفاتحة.

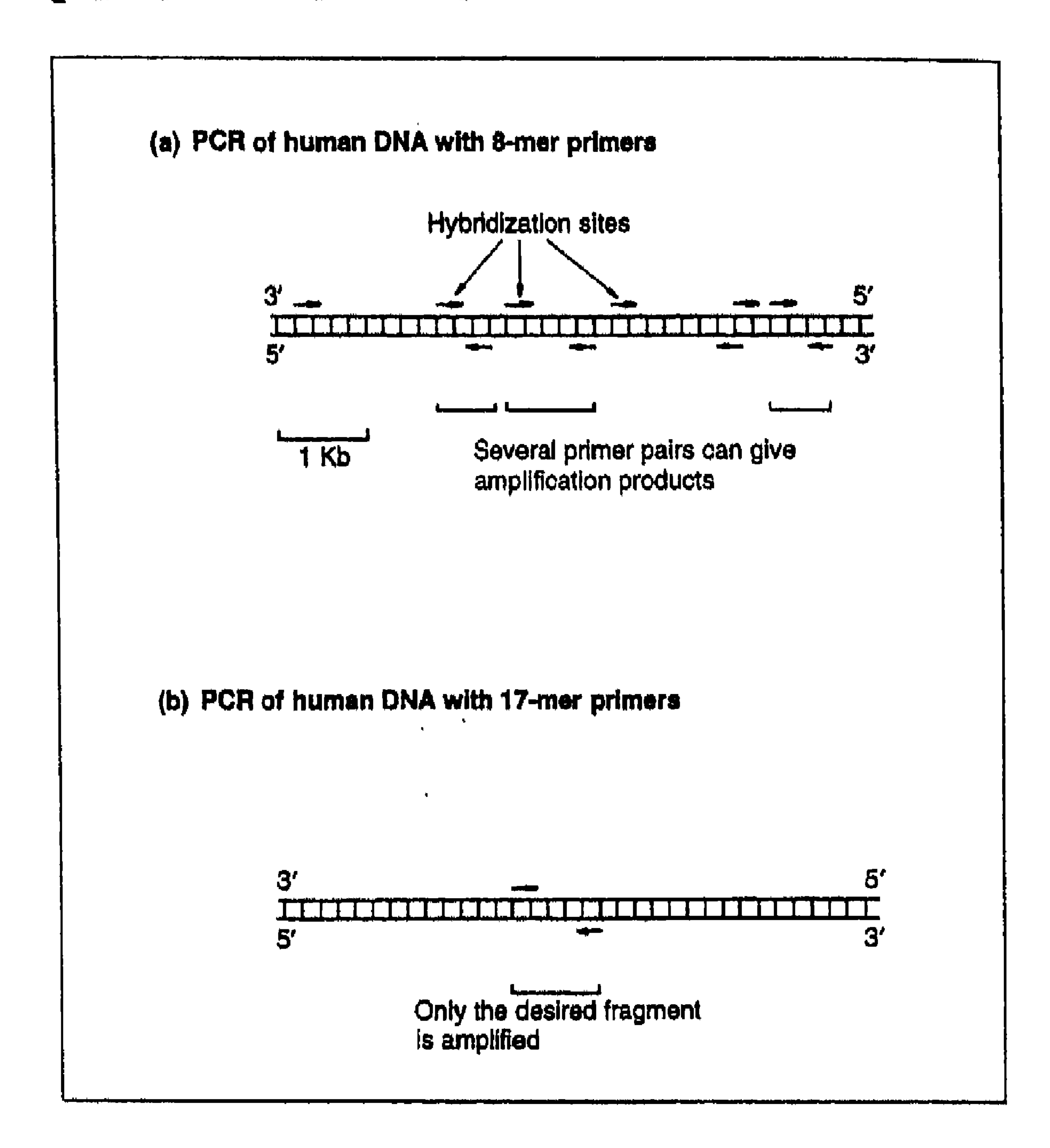
يجب أن يزيد شظية دنا المطلوب تكبيرها عن ٣ كيلو قاعدة فى الطول والحالة المثالية أن تكون أقل من ١ كيلو قاعدة. وفى حالة الشظايا التى تصل طولها إلى ١٠ كيلو قاعدة يمكن تكبيرها بواسطة طرق PCR مثالية أخرى. ولكن عامة كلما زاد طول الشظية كلما قلت كفاءة التكبير وكان من الصعب الحصول على نتائج ثابتة غير متغيرة. عامة يمكن تكبير شظايا طويلة حتى ٤٠ كيلو قاعدة وذلك ممكن ولكن يحتاج ذلك طرق خاصة معينة.

ولذلك من المهم تحديد طول البادىء. لو أن البادىء صغير فإنه سيهجن أجزاء غير مطلوبة ويعطى تهجين غير مطلوب. لتوضيح ذلك فإن لنا أن نتصور أن دنا

الكلى للإنسان يستخدم فى تجربة PCR مع زوج من البادئات طولها ٨ نيوكليوتيدات (يمكن أن تسمى بلغة علم البيولوجيا ٨ ميزر 8- mers).

ونتيجة ذلك أن عدد من الشظايا المختلفة (شكل ١٢٣) يتم تكبيره. وذلك لأن مناطق الإلتحام لهذه البادئات المتوقع حدوثها هى فى وسط واحد لكل $٤^٨$ وحيث أن $٤^٨$= ٦٥٥٣٦ زوج قاعدة bp فإن ذلك يوح أنه يوجد تقريبا ٤٦٠٠٠ مكان موقع ممكن وذلك فى عدد ٣ مليون كيلو قاعدة kb من النيوكليوتيدات التى تكون الطاقم الوراثى للإنسان human genome. وذلك يوضح أنه من غير المناسب أن زوج من ٨ ميرز للبادىء (أى كل بادىء يتكون من ٨ ميرز والبادىء الآخر أيضا يتكون من ٨ ميرز ولذلك فإن الزوج من البادىء يكون طول كل واحد ٨ ميرز لأننا دائما نستعمل زوج من البادىء وليس بادىء مفرد) سيعطى تكبير مفرد معين single, specific amplification product فى حالة دنا الإنسان. ولكن فى حالة إستعمال بادىء ١٧ ميرز 17-mers primer يكون له مكان أى موقع واحد متوقع كل $٤^{١٧}$= ١٧١٧٩٨٦٩١٨٤ زوج قاعدة bp. هذا الرقم يكون أكبر من خمسة مرات ضعف طول الطاقم الوراثى للإنسان ولذلك فإنه من المتوقع أن زوج من بادئات ١٧ ميرز (يمكن أن تكتب ١٧ ميرز 17-mers) سيعطى تكبير مفرد معين (شكل ١٢٣ b) A pair of 17-mers primers should therefore give a single amplication product.

ولكن السؤال هنا لماذا لا نستعمل بادئات طويلة كلما أمكن ذلك؟ لأن البادئات الطويلة تؤثر على سرعة التهجين مع دنا الأصلى، حيث أن البادئات الطويلة تهجن ببطء حيث أنه كلما زاد طول البادىء كلما كانت عملية التهجين أبطأ. ومن الجدير بالذكر أن كفاءة عملية PCR تقاس بعدد جزيئات أى شظيات دنا الناتجة، حيث أن عدد الشظايا يقل لو أن البادىء طويل جدا وذلك لأن التهجين الكامل لهذا البادىء مع جزيئ دنا الأصلى لا يحدث فى الوقت المحدد لدورة التفاعل reaction cycle. عامة البادئات أطول من ٣٠ ميريندر إستعمالها.

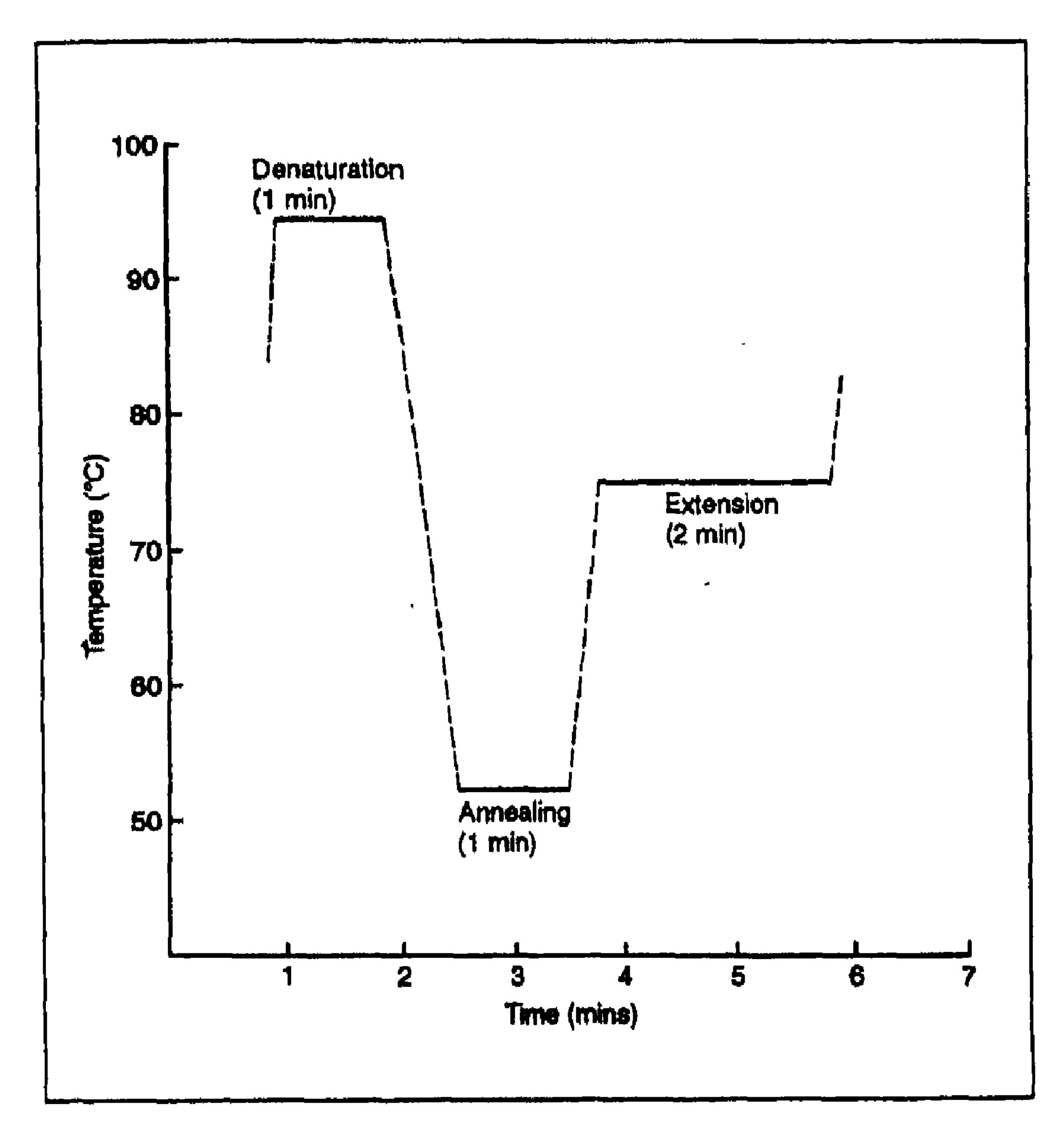


شكل ١٢٣ : أطوال البادئات عامل محدد حرج للتخصص فى PCR.

٢ - إستخدام درجات الحرارة المطلوبة :

Working out the correct temperature to use

أثناء كل دورة PCR فإن مخلوط التفاعل reaction mixture يتم تعريضه لثلاثة درجات مختلفة على التوالى وهى كما يلى (شكل ١٢٤). يمكن عمل ذلك بجهاز أتوماتيكى يسمى thermocycler:



شكل ١٢٤: درجات الحرارة المستخدمة أثناء PCR.

أ – درجة حرارة الدنترة **denaturation temp** وهى عادة ٩٤ مئوية والتى تسبب كسر التزاوج بين القواعد وينتج عنها حلزون دنا مفرد والذى يعمل كأصل **tempelate** فى الدورة الثانية أى الدورة التالية لتخليق دنا.

ب – درجة حرارة التهجين أى درجة حرارة عكس الدنترة **hybridization (annealing) or annealing temp** والتى عندها يلتصق البادىء بدنا الأصل **.template**

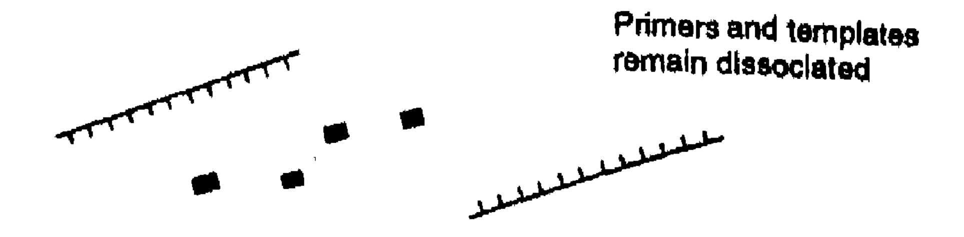
ج – درجة حرارة التخليق **the extension temperature** وهى الدرجة التى تحدث

عندها تخليق دنا وهى عادة تكون حوالى ٧٤ مئوية وهى أقل من الدرجة المثلى لأنزيم بلمرة *Taq* (*Taq* polymerase).

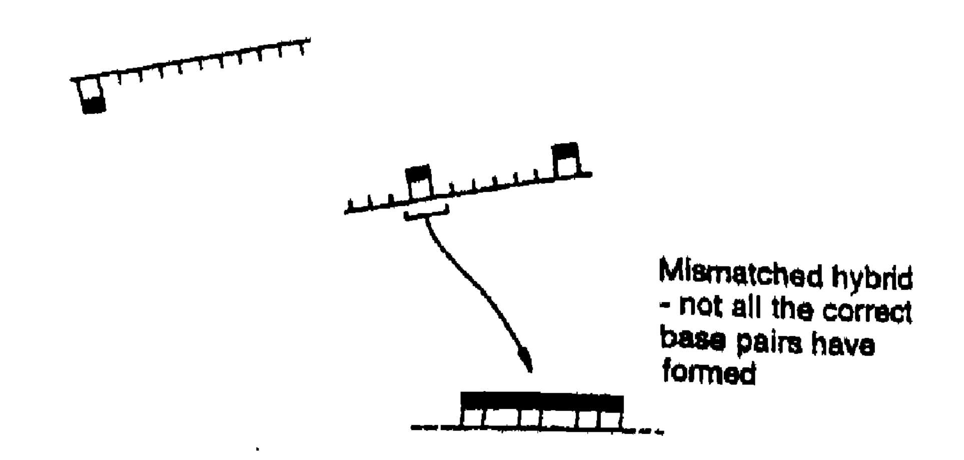
درجات الحرارة هامة جدا ومثلا درجة الحرارة لعكس الدنترة **annealing** هامة لأنها تؤثر على نوعية أى تخصص التفاعل **specificity of the reaction**. أما عملية التهجين بين دنا البادىء ودنا الأصل فإنها معتمدة على درجة الحرارة، حيث أنه فى درجات الحرارة العالية لا يحدث تهجين أى لا يحدث إلتحام بين البادئات وبين الأصل ويظلان منفصلين **remain dissociated** (شكل ١٢٥). فى درجات الحرارة المنخفضة جدا يحدث تهجين أى هجين خاطئة التقابل والتزاوج **mismatched hybrid** وبالرغم من ذلك تكون ثابتة. تعرف حالة الهجين خاطئة التقابل والتزاوج بأن بعض حالات التقابل والتزواج تكون غير صحيحة **Ones in which not all the correct base pairs have formed**. فى حالة حدوث ذلك فإن الحسابات المبكرة للأطوال المناسبة للبادئات تكون غير متناسبة أى غير صحيحة حيث أنها مبنية أساسا على الإفتراض أن التهجين بادىء- أصل سليمة وصحيحة مع عدم وجود أخطاء فى ذلك وتكون متكونة بالطرق السليمة **perfect primer- template hybrids**. وإذا أستمر الحال كذلك بالنسبة لتكون هجين خاطئة التقابل والتزواج وتكون ثابتة فإن أعداد هذه المواقع من التهجينات غير السليمة تزداد بدرجة كبيرة وهكذا يحدث التكبير فى مواقع غير مطلوبة على جزيئ دنا المطلوب تكبيره.

يجب أن تكون درجات حرارة عكس الدنترة **annealing temperature** منخفضة بدرجة كافية ليمكن حدوث التهجين بين البادىء والأصل ولكنها تكون أيضا مرتفعة بدرجة كافية لتمنع تكوين الهجين الخاطئة التزاوج والتقابل.

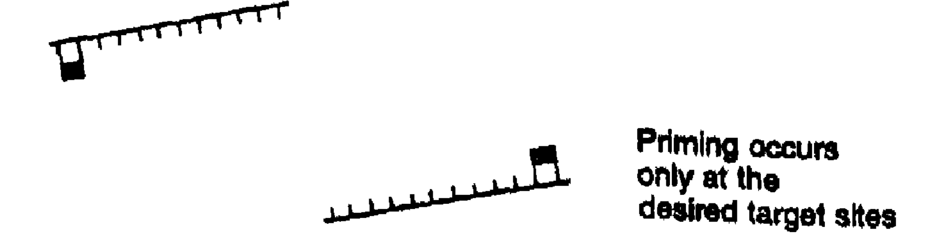
(a) Annealing temperature is too high



(b) Annealing temperature is too low



(c) Correct annealing temperature



شكل ١٢٥ : تأثير درجات الحرارة على تهجين البادئات مع دنا الأصل.

يمكن تحديد هذه الدرجة بتقدير درجة حرارة الإنصهار melting temperature للهجين بادىء أصل (primer- template hybrid) ويرمز لهذه الدرجة Tm. ولذلك تعرف هذه الدرجة أى Tm of the primer template hybrid بأنها درجة الحرارة

التى يحدث عندها إنفصال تزاوج القواعد أى الإنصهار (الإنصهار melts تعنى إنفصال تزاوج القواعد) للهجين بطريقة صحيحة مثالية. درجة واحدة أو أثنين اقل من هذه الدرجة ستكون منخفضة بدرجة كافية لتسمح تكوين الهجين الصحيح بادىء- أصل ولكنها تكون مرتفعة بدرجة كبيرة جدا لتكوين هجين ذو خطأ تقابل وحتى يكون خطأ تقابل واحد فقط single mismatch لأن يكون ثابت أى أن هذه الدرجة تكون مرتفعة جدا ولا تسمح بحدوث خطأ تقابل ولو حتى واح فقط وحتى لو حدث لن يكون ثابت a single mismatch to be stable.

يمكن تقدير Tm بالتجارب العديدة حيث يمكن معرفتها ولكنها عادة تحسب من المعادلة الآتية (شكل ١٢٦).

Primer sequence: 5′ AGACTCAGAGAGAACCC 3′

4Gs 5Cs 7As 1T

$$T_m = (4 \times 9) + (2 \times 8)$$
$$= 36 + 16$$
$$= 52°C$$

شكل ١٢٦: حساب Tm لبادىء معين

$$Tm = (4x\,[G+C] + (2x\,[A+T])^{\circ}C$$

حيث أن:

[G+C] هى عدد النيوكليوتيدات G، C فى تتابعات البادىء

[A+T] هى عدد النيوكليوتيدات T، A فى تتابعات البادىء

يمكن تحديد درجة التجربة من حساب Tm لكل بادىء وأن تستعمل درجة حرارة فى التجربة أقل من الدرجة المقدرة من المعادلة بدرجة أو أثنين وهى تكون درجة مناسبة جدا لسماح حدوث التهجين بين البادىء والأصل. عند تحضير وتصميم

البادئين لابد أن تكون Tm لهما واحدة. وفى حالة عكس ذلك أى درجة الحرارة غير متماثلة فى البادئين فإن درجة الحرارة لأحد البادئين تكون أعلى بكثير من درجة حرارة البادىء الآخر، وبالطبع ستكون النتيجة مضللة.

وللتعويض فى المعادلة فى حالة البادىء التالى:

5̀ AGACTCAGAGAGAACCC3̀

سيكون ٤ G، ٥ C، ٧ A، واحد T:

Tm= (4x9) + (2x8)

= 36 + 16

= 52 C

أى أن الدرجة المثلى هى ٥٢ مئوية والدرجة المستعملة فى التجربة هى ٥٠ أ، ٥١ درجة مئوية.

٣ - بعد PCR: دراسة نواتج PCR

After the PCR: Studying PCR products

عادة تكون PCR بداية لتجارب كثيرة وحيث أن ناتج PCR يستعمل فى هذه التجارب حيث أن تكبير دنا ناتج من PCR يتم إستخدامه تبعا للمطلوب بعد ذلك ويكون ذلك فى مدى واسع من التجارب وذلك للحصول على معلومات عن جزيئ دنا المستعمل كأصل. توجد طرق كثيرة جدا من التجارب لدراسة التكبير الناتج عن PCR ويمكن تلخيص أهم هذه الطرق فيما يلى:

أ – الفصل بالهجرة فى وسط غروى فى مجال كهربائى. الغروى يكون agarose. **Agarose gel electrophoresis**

ب – التحليل المباشر لتتابع القواعد فى دنا الناتج من التكبير **Direct sequence analysis of the PCR product**

جـ – طرق التحليل التى تشمل توطين ناتج PCR: **Analysis that involve cloning the PCR product**

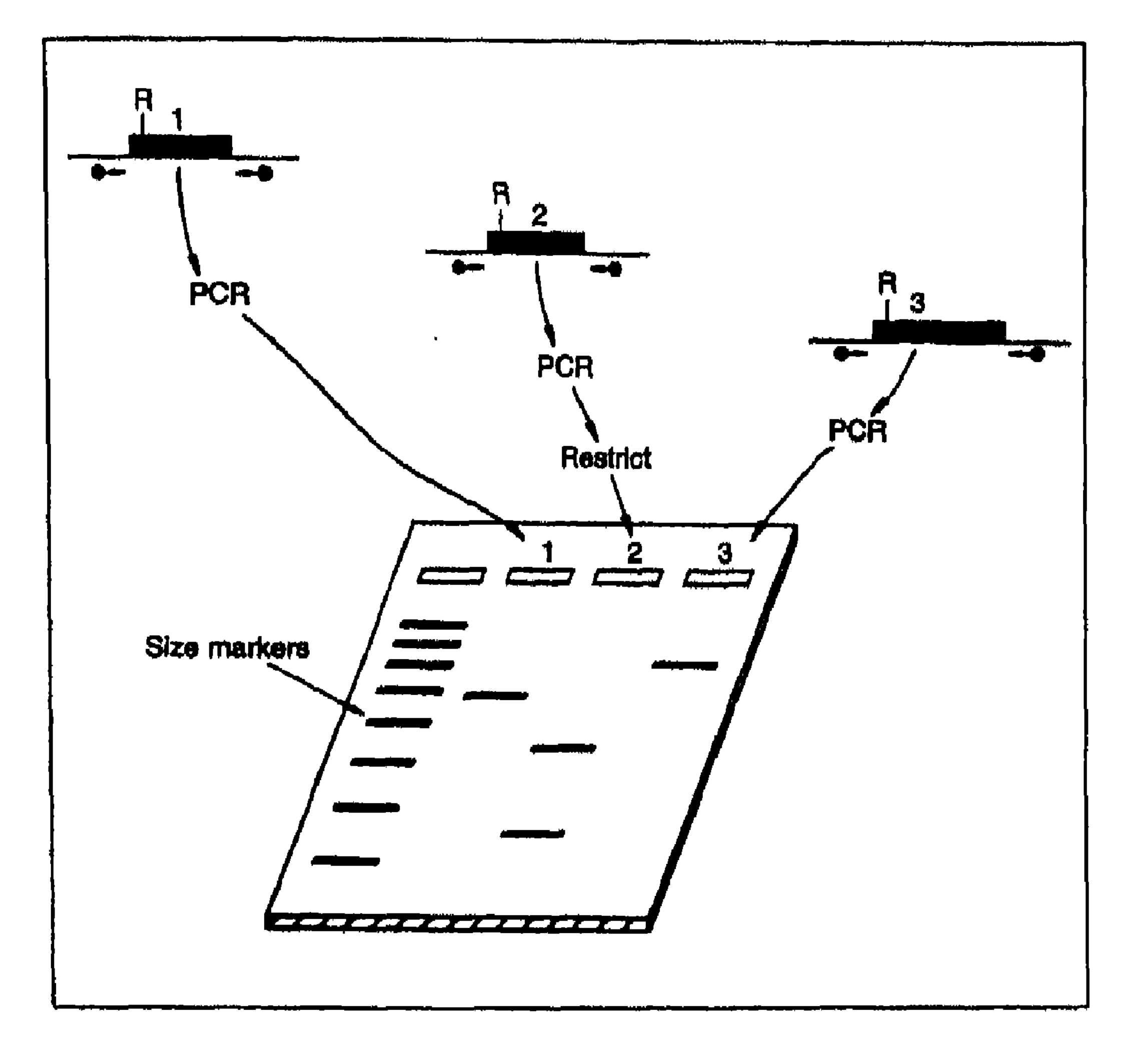
وفيما يلى شرح تفصيلى لذلك:

أ- Gel electrophoresis of PCR products:

فى أغلب تجارب PCR يتم التعرف على النتيجة وذلك بأخذ جزء من الناتج المكبر amplified reaction mixture وتحليله بالجهاز ويكون الوسط الغروى هو أجاروز. تكون النتيجة تكون حزمة أى شريط band ويمكن رؤيتها بعد صبغها ببروميد الأثيديم وتكون الحزمة عبارة عن دنا المكبر. لو أن ناتج التكبير من دنا تركيزه قليل أى كميته قليلة فإنه يمكن الإستدلال على وجوده بطريقة صزرن Southern hybridization والتى سبق شرحها بالتفصيل. إذا لم تظهر الحزمة أو ظهرت أكثر من حزمة فإن ذلك يدل على وجود خطأ فى التجربة ويجب تكرارها.

وبذلك فإن إستخدام الهجرة فى وسط غروى آجاروز فى مجال كهربائى agarose gel electrophoresis تستخدم لتوضيح حدوث ونجاح تجربة PCR. ولكن فإن مزايا أخرى أكثر من ذلك بكثير. مثال ذلك أنه يمكن تحديد مواقع القطع restriction sites فى الجزء المكبر من دنا الأصل وذلك بمعاملة ناتج تجربة PCR بإنزيم قطع restriction endonuclease وذلك قبل إختبار العينة بواسطة جهاز electrophoresis. علاوة على ذلك يمكن إستخدام الحجم الدقيق لدنا الناتج من PCR كأساس لمعرفة هل دنا الأصلى يحتوى على طفرة زيادة أو نقص insertion or deletion mutation فى المنطقة المكبرة (شكل ١٢٧) أم لا.

فى كلا الحالتين السابقتين فإن تجربة PCR قد أستخدمت كطريقة محورة من تحليل RFLP analysis RFLP مع وجود ميزة عن الطريقة التقليدية وهى أن بدء التجربة يكون بواسطة كمية قليلة جدا أى تركيز منخفض جدا من مادة البداية starting material ويمكن إستخدامها بنجاح وبنتائج جيدة ودقيقة، وهكذا أصبحت PCR- based approach أكثر ملائمة للتطبيق والإستخدام فى حالات كثيرة ومنها مثال حالة prenatal screening أى الكشف قبل الولادة والفحوصات قبل الولادة.



شكل ١٢٧ : ناتج PCR يوضح فى جهاز electrophoresis وبذلك فإن gel electrophoresis تعطى معلومات على جزيئ دنا الأصلى. فالحارة ١ توضح ناتج PCR عادى غير معامل بإنزيم قطع والحارة ٢ توضح ناتج PCR معامل بإنزيم قطع والذى يعمل على الموقع R. حارة ٣ lane 3 توح أن دنا الأصلى يحتوى على إدخال insertion (أى زيادة فى الحجم) فى المنطقة المكبرة.

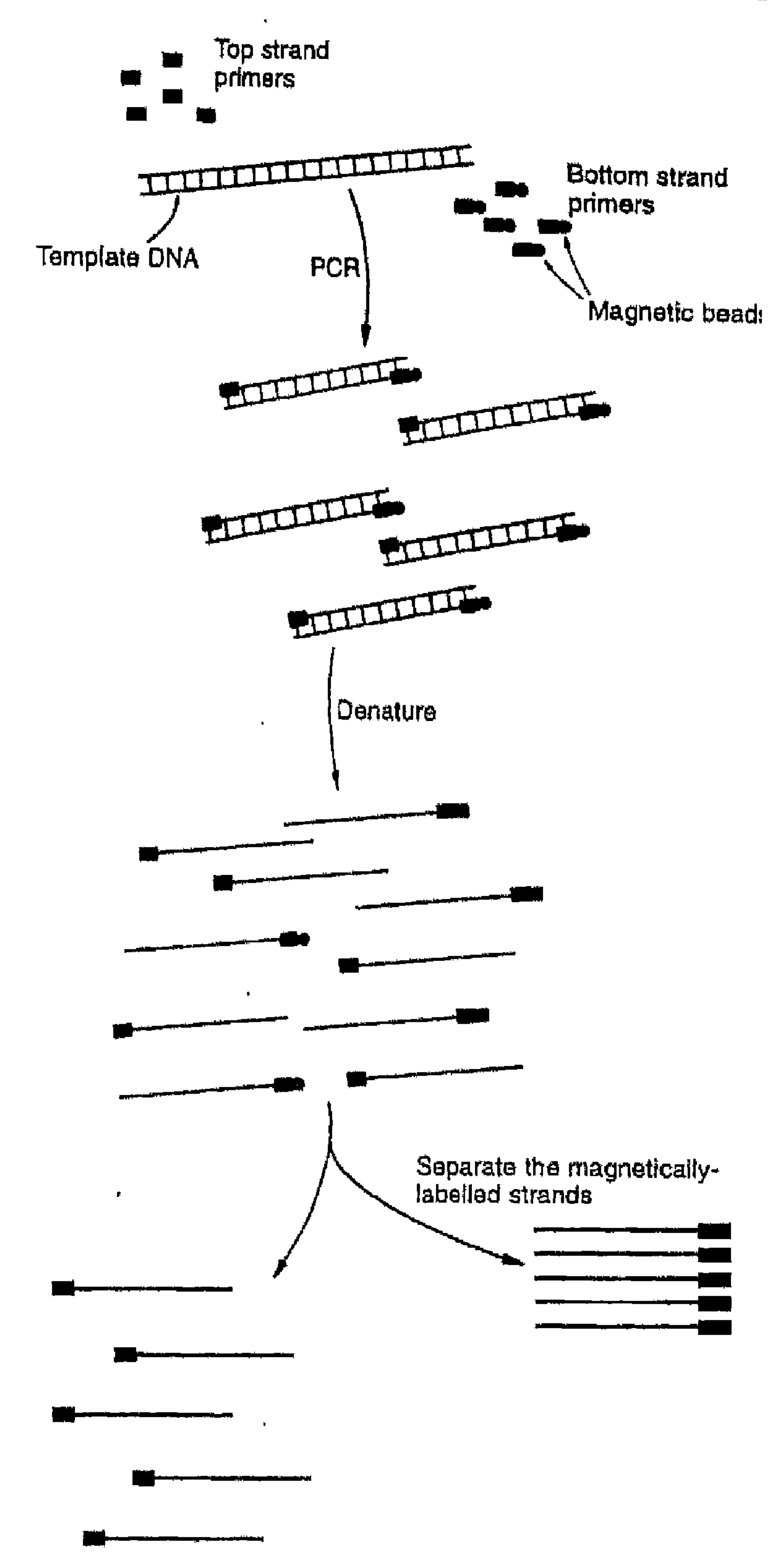
ب - Direct sequence analysis of PCR products:

لو أن gel electrophoresis تكون غير كافية لتقديم معلومات مفيدة فى هذا الصدد فإن الخطوة الثانية تكون لتحديد تتابع القواعد فى شظية دنا المكبرة.

The sequence of the amplified DNA fragment

ويمكن ذلك بإحدى طريقتين وهى إما بالتحليل المباشر لناتج PCR أو أولا بتوطين ناتج PCR ثم إتباع الطرق القياسية للتعرف على تتابع القواعد sequencing.

طريقة التحليل المباشر لناتج PCR يكون مبنى أساسا على طريقة Sanger-Coulson ولذلك فإنها تحتاج حلزون دنا مفرد ssDNA كمادة للبداية. نتيجة PCR هى عبارة عن دنا حلزون dsDNA وهكذا فإنه يلزم إجراء بعض الخطوات للحصول على حلزون دنا مفرد من هذا الدنا الثنائى الحلزون. يوجد لذلك طرق عديدة ومنها مايأتى. وتفضل عامة هذه الطريقة عن الطرق الأخرى وهى بداية PCR ببادىء عادى وبادىء آخر محور. يتم تحوير البادىء بحيث يكون دنا الناتج عنه يكون من السهل جدا فصله. ومن إحدى الطرق المتميزة لعمل التحوير وهى لصق كرات مغناطيسية صغيرة بالبادىء attaching small magnetic beads المطلوب تحويره. ثم تجرى عملية PCR بواسطة بادىء عادى وبادىء ممغنط ثم بعد حدوث التكبير وفى نهاية التجربة تجرى عملية دنترة بالتسخين لدرجة معينة وهكذا ينفصل الحلزونين عن بعضهما ويتم فصل الناتج إلى مجموعتين مجموعة ذات بادىء عادى ومجموعة ذات بادىء ممغنط (شكل ١٢٨). يمكن عمل ذلك بطريقة أخرى وهى إستخدام بادىء معلم بالبيوتين أى ملتحم به بيوتين biotin- labeled primer، وبعد PCR يمكن فصل حلزون دنا ذو البيوتين وذلك بربطة أى لصق مع الأفيدين avidin، يعتبر الأفيدين بيوتين له جاذبية عالية للبيوتين.



شكل ١٢٨ : طريقة للحصول على حلزون دنا مفرد من دنا ثنائى الحلزون العادى الناتج من PCR. أحد البادئين عادى والآخر معلم بكريات ممغنطة. بعد PCR يتم عمل دنترة ثم يتم عمل دنترة ثم يتم فصل الحلزون العادى من الحلزون الممغنط ويتم الفصل إلى مجموعتين.

بعد الحصول على حلزون دنا مفرد فإن بقية الطريقة هى إتباع طريقة سانجر-كولسون Sanger- Coulson method وحيث أنه يتم تخليق عائلات أو مجاميع من جزيئات دنا ذات أطوال مختلفة ذات نهاية معينة families of chain- terminated molecules ويتم التخليق بواسطة إنزيم بلمرة دنا مثل إنزيم sequenase. والمأخذ الوحيد على ذلك هو أنه فى حالات تتابع القواعد القياسية فإن البادىء يلتحم anneals بموقع معين فى تركيب الحامل أو الناقل الوسيط vector (والحامل أو الناقل الوسيط هنا M13 أى M13 vector) ويكون قريب من polylinker والذى تم توطين دنا المطلوب تحليل تتابع القواعد فيه أى تم إدخال الشظية المطلوب فحصها فى الناقل الوسيط M13. فإن البادىء العام universal primer الشامل الذى يستخدم فى حالة الحامل أو الناقل الوسيط M13 لايمكن إستخدامه فى حالة ناتج PCR حيث أن الأخير لايحتوى على تتابع القواعد المناسبة للبادىء والتى توجد فى الحامل M13. ولذلك فإنه بدلا من البادىء العام الشامل المستخدم فى حالة M13 يستخدم البادىء الذى أستخدم فى بداية طريقة PCR أى يستخدم إحدى البادئين اللذين إستخدما فى بداية طريقة PCR لعمل تفاعل تتابع القواعد used to primer the sequencing reactions. يجب أن يكون هذا البادىء مكمل للحلزون المفرد الناتج من PCR ولذلك يكون البادىء الغير معلم بالكريات الممغنطة أو بالبيوتين.

جـ - توطين Cloning PCR products :PCR

لو كان المطلوب أكثر عن دنا المكبر فإنه فى هذه الحالة يتم لصق الشظايا الناتجة من التكبير فى ناقل وسيط أى حامل ويتم الفحص بعد ذلك بأى من الطرق المثالية المناسبة لدراسة دنا الموطن السابق شرحها فى أبواب سابقة، ولكن توجد صعوبات فى هذه الطريقة.

أول صعوبة تختص بنواتج عملية التكبير وحيث أن نهايات الشظايا الناتجة فى هذه الحالة تكون مستقيمة blunt ends وفى هذه الحالة لابد من لحمها مع دنا الناقل

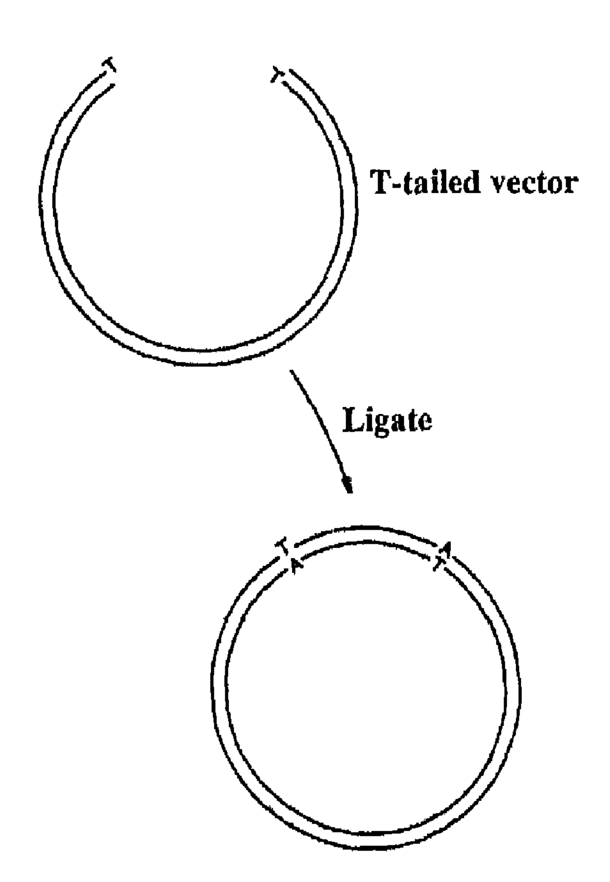
الوسيط، وأيضا يكون هذا الدنا الناقل الوسيط له أيضا أطراف مستقيمة وتكون بإستعمال طريقة الإلتحام للأطراف المستقيمة blunt-end ligation أو بديل آخر عن ذلك هو لحم أطراف الشظايا الناتجة عن التكبير بواسطة لاصقات أى رابطات أى لاحمات linkers أو مأقلمات adaptors وبذلك تصبح الأطراف لزجة أى تصبح أطراف الشظايا لزجة. ولكن لسوء الحظ فإن هذه الإختبارات لا تحدث بهذه السهولة. فإن إنزيم البلمرة *Taq* يميل إلى إضافة نيوكليوتيد إضافية عادة أدينوزين لطرف كل حلزون تقوم بتخليقه. هذا يعنى أن ناتج PCR هو دنا ثنائى الحلزون لزج النهاية وليس مستقيم، حيث أنه بدلا من النهايات ٣' يوجد نيوكليوتيد مفرد معلق بارز overhang (شكل ١٢٩). يمكن إزالة هذا الجزء البارز بواسطة معاملته بإنزيم exonuclease وينتج عن ذلك ناتج تكبير له نهايات مستقيمة، ولكن لاتعتبر هذه الطريقة مفيدة أو مرغوبة حيث أنه من الصعب منع الإنزيم من نشاطه الزائد والذى يسبب ضرر للجزيئ حيث أنه سيحلل أجزاء أخرى من الجزيئ وبذلك يحدث ضرر زائد.

```
 5'                                                     3'
  AGACTCAGA.......................AACTTATTTA
  |||||||||                       |||||||||
 ATCTGAGTCT.......................TTGAATAAA
 3'                                                   5'
```

شكل ١٢٩: عديد النيوكليوتيدات مخلق بواسطة إنزيم بلمرة Taq (Taq polymerase) ويكون عادة له أدينوسين أضافى فى الطرف ٣ من الجهتين.

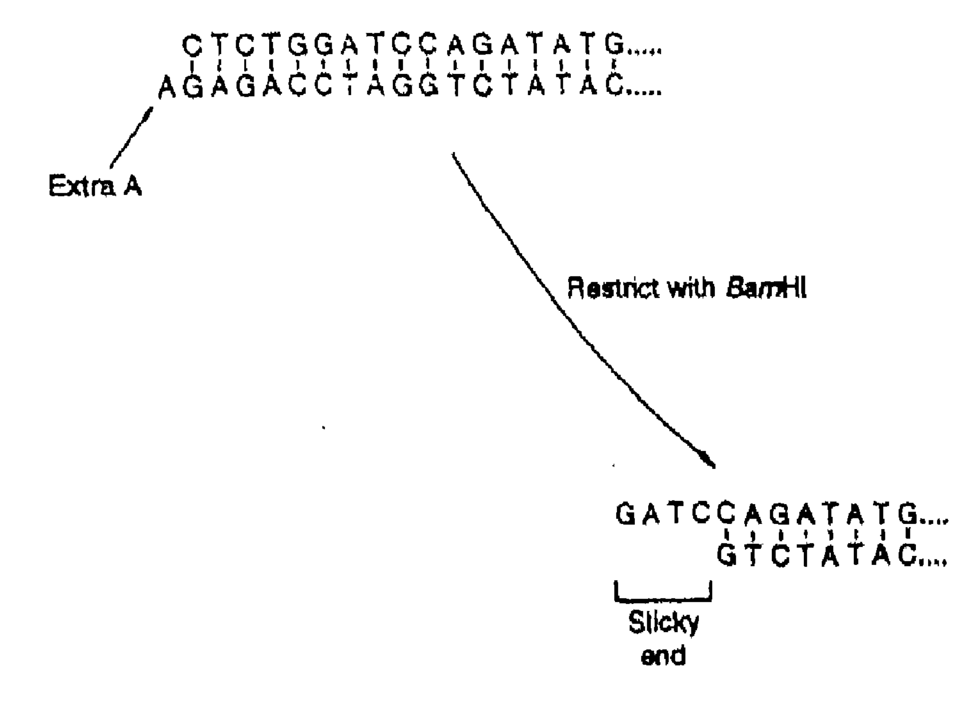
أحد الحلول هو إستخدام ناقل وسيط خاص والذى يحمل بروزات T أى T overhangs والذى يمكن لحمه مع شظية دنا المكبرة (شكل ١٣٠) السابقة. هذا الناقل الوسيط يمكن تحضيره عادة وذلك بقطع دنا الناقل الوسيط القياسى standard vector لتكوين طرف مستقيم ثم المعاملة بعد ذلك بإنزيم بلمرة *Taq* فى وجود dTTP. يحدث ما سبق فى عدم وجود بادىء فإن إنزيم البلمرة يمكنه إضافة

نيوكليوتيد T إلى الأطراف ٣' فى الأطراف المستقيمة لجزيئ الناقل الوسيط وينتج عن ذلك ناقل وسيط ذيل T-tailed vector T والذى يمكن أن يدخل فيه ناتج PCR أى الشظية المكبرة السابق وصفها. بمعنى آخر يمكن أن نلتحم شظية التكبير مع دنا الناقل الوسيط عن طريق التزاوج بين A، T (شكل ١٣٠).



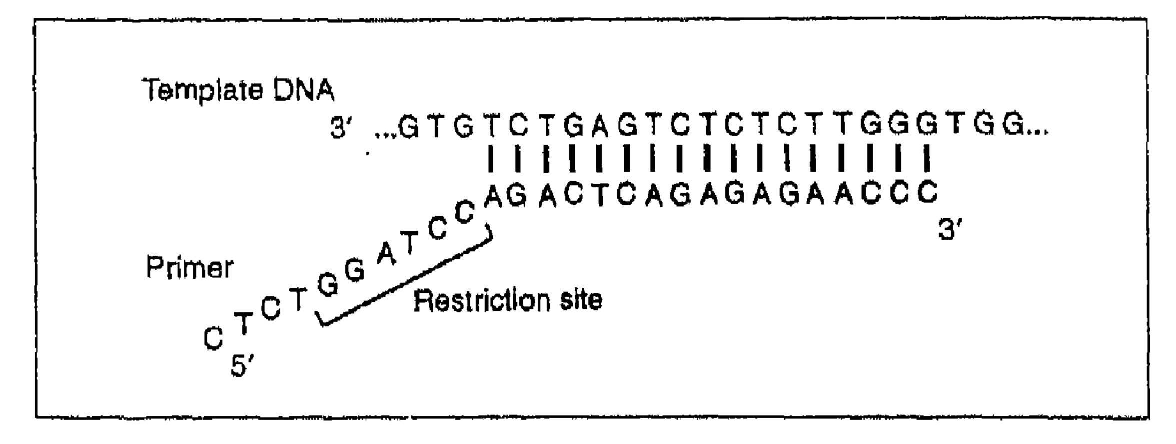
شكل ١٣٠ : إستخدام ناقل وسيط مذنب (مذيل) يتم توطين شـــظية التكـــبير فيـــه Using a special T- tailed vector to clone a PCR product.

الحل الثانى، يوجد حل ثان أكثر تفضيلا من الحل الأول وهو تصميم بادئات تحتوى على مواقع قطع restriction sites. بعد عمل عملية التكبير فإن الشظايا الناتجة تعامل بإنزيم قطع r. e. والتى تقطع كل جزيئ فى داخل تتابع البادىء primer اى تقطع كل جزيئ من داخل البادىء. ينتج عن القطع أطراف لزجة والتى يمكن أن تلتحم بسهولة مع ناقل وسيط مثالى (شكل ١٣١).



شكل ١٣١ : الحصول على شظية ناتجة من PCR لها أطراف لزجة عن طريق وجـود بادىء له تتابعات بها مكان قطع.

الحل الثالث يمكن إستخدام أنواع أخرى من البادئات يكون مكان القطع فيها غير موجود أى لاتحتوى على مواقع قطع أى أن مكان القطع فيها غير موجود أصلا فى البادىء بعكس الحالة السابقة والشكل السابق. وفى هذه الحالة يضاف أماكن قطع إلى تتابعات البادىء على هيئة جزء صغير أى شظية صغيرة عند كل OI (شكل ١٣٢)، أى يتم لحم جزء صغير أى شظية صغيرة إضافية للبادىء. وهذه الشظية الصغيرة أى الجزء الصغير لا يمكن أن يلتحم أى لا يهجن أى لايتوافق مع دنا الأصل ولكنه من ذلك فإنها تنسخ أثناء عملية التكبير فى PCR ويكون نتيجة ذلك أى ناتج عملية PCR أى ناتج تكبير يحمل مناطق طرفية.



شكل ١٣٢: بادىء فى عملية PCR له موقع قطع موجود على جزء زائد من الطرف 5`.

A PCR primer with a restriction site present within an extension at the 5' end

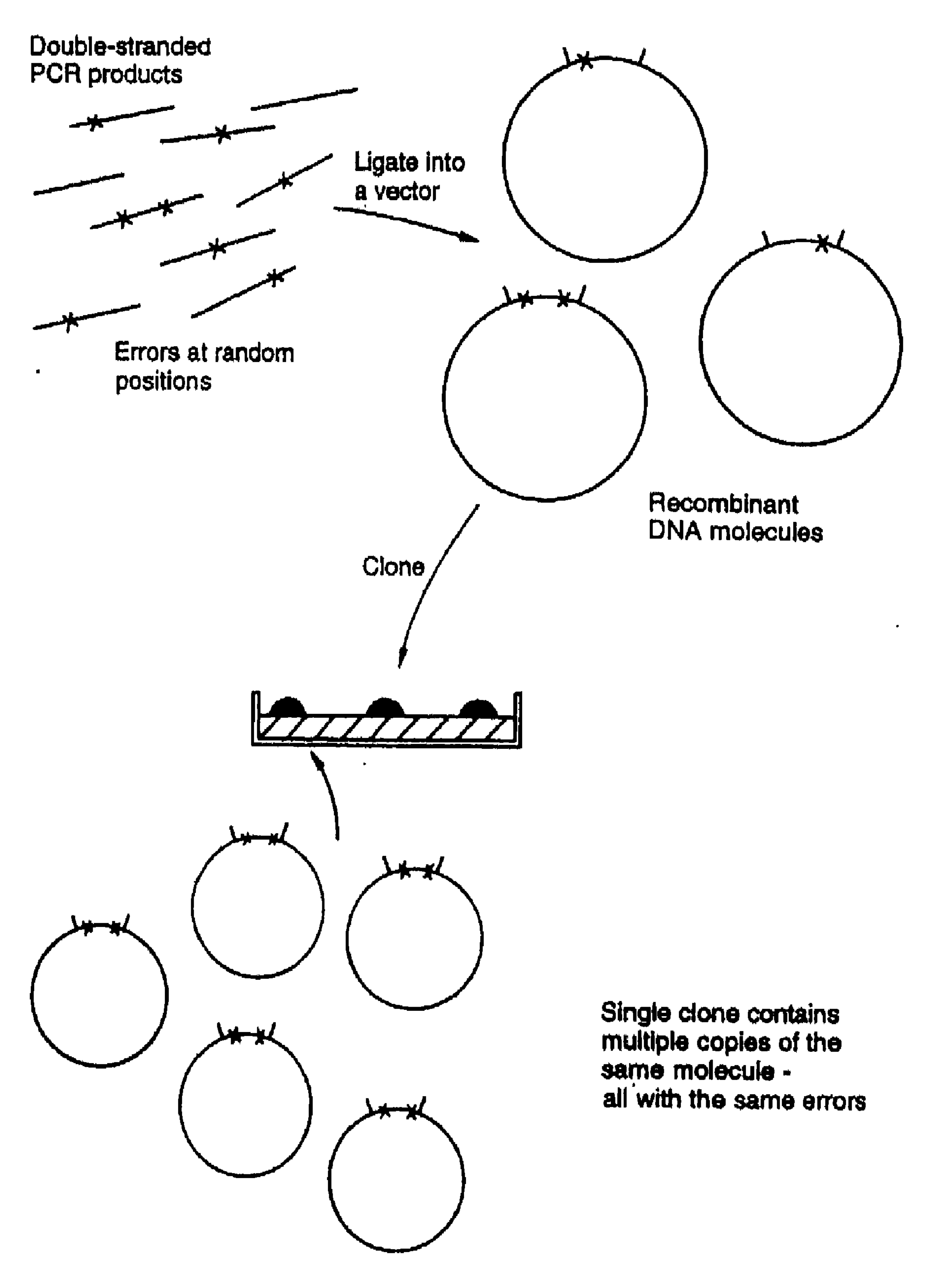
د- مشاكل عن معدل الأخطاء فى حالة إستعمال إنزيم البلمرة *Taq*
Problems with the error rate of *Taq* polymerase

جميع أنواع أنزيمات البلمرة لدنا تحدث اخطاء أثناء عملية تخليق دنا، حيث وقتيا أى كل حين أى بعد كل فترة occasionally يتم إضافة نيوكليوتيد غير صحيحة أثناء تخليق حلزون دنا. أغلب إنزيمات البلمرة قادرة على تصحيح هذه الأخطاء وذلك بعكس أو إزالة أو تفويت أو قفز على الخطأ وإعادة تخليق التتابع السليم. وهذه الحالة تسمى قراءة ناتج الطبع أى قراءة البروفة proofreading وتعتمد أساسا على وجـود أنزيم بلمرة يتميز بأن له نشاط إنزيم exonuclease من الجهة ٣' إلى الجهة O' (3` to 5` exonucleasee activity). إنزيم بلمرة *Taq* يظهر وكأنه حالة نشاط قراءة البروفة أى قراءة ناتج الطبع أى قراءة ناتج التخليق ولذلك فإنه غير قادر على تصحيح الأخطاء الخاصة به. يعنى ذلك أنه ليس من الضرورى دائما أن إنزيم البلمرة *Taq* ينتج عنه نسخ دنا مماثلة تماما للأصل أى أنها تكون غير دقيقة ومختلفة قليلا عن الأصل لوجود الأخطاء. تقدر سرعة أو معدل الخطأ بدرجة خطأ واحد لكل تسعة آلاف نيوكليوتيد دنا مختلفة. تعتبر هذه النسبة غير هامة ولكن يمكن

ترجمتها على أساس التكبير أنها خطأ واحد لكل ثلاثمائة زوج قاعدة (300bp) من ناتج التكبير والذي يتم الحصول عليه بعد ثلاثون دورة. ولأن PCR يشمل عمل نسخ من نسخ فإن الأخطاء الناتجة عن إنزيم البلمرة تتجمع تدريجيا وأن الشظايا الناتجة بعض منها على أخطاء مبكرة والبعض الآخر أخطاء وسطيه أو أخطاء حديثة، وحيث أن الأخطاء الحديثة تحدث فى الدورات الأخيرة والأخطاء المبكرة فى الدورات الأولى وهكذا فى نهاية الإختبار نحصل على أخطاء مجمعة.

فى كثير من التطبيقات لاتعتبر هذه الأخطاء ذات أهمية. عامة فإن إستعمال الطريقة المباشرة لدراسة تتابع القواعد فى الأصل template sequence توضح التركيب الصحيح وتتابع القواعد الصحيح للأصل بالرغم من أن ناتج PCR يحتوى على أخطاء ناتجة عن إنزيم البلمرة *Taq*. عامة نسبة الخطأ منخفضة وتعتبر غير هامة نسبيا لأن هذه الأخطاء موزعة عشوائيا وهكذا كل شظية مكبرة بها خطأ فى نيوكليوتيد معينة في موقع معين يقابلها أعداد كبيرة جدا من الشظايا سليمة صحيحة وهكذا مرة أخرى نسبة الخطأ منخفضة وتعتبر غير هامة.

ولكن فى حالة توطين ناتج PCR أى الشظايا الناتجة عن PCR والتى كما سبق القول بها نسبة من الخطأ. فنتيجة ذلك وعند إدخال الشظايا الناتجة عن PCR سواء الصحيحة والخاطئة في ناقل وسيط وإكثار هذا الناقل الوسيط فى خلية مثل البكتريا فالنتيجة لهذا الإكثار أن النتيجة تكوين أعداد كبيرة من شظايا صحيحة وأيضا أعداد كبيرة نسبيا من شظايا خاطئة وستكون هذه الشظايا الخاطئة مختلفة عن تركيب DNA الأصلى. ولذلك فإن تجارب توطين نواتج PCR غير موثوق فيها إلى حد ما لهذا السبب وهو تكبير الخطأ فى الشظايا الناتجة عن PCR (شكل ١٣٣). ولذلك يفضل عن هذه الطريقة، الطريقة السابقة وهى التحليل المباشر للشظايا الناتجة من PCR بدلا من هذه الطريقة وهى توطين الشظايا الناتجة من PCR.



شكل ١٣٣ : تأثير معدل الخطا لإنزيم بلمرة *Taq* والذى يصبح مؤثر ومحسوس عند توطين الشظايا الناتجة من PCR بإستخدام خلايا البكتريا.

إستخدام وأستعمال طريقة PCR
Applications Of PCR

لأول وهلة يبدو أن طريقة PCR هى طريقة عادية فائدتها تكبير جزء من دنا، ولكن الحقيقة خلاف ذلك. يلاحظ فى هذه الطريقة أن تتابع القواعد فى الحواف border sequences يجب أن يكون معروف وإلا لا يمكن تطبيق هذه الطريقة وهى من عيوب هذه الطريقة. حيث أن هذا العامل يكون محدد فى عدم القدرة على معرفة وتحليل مناطق دنا بواسطة PCR عندما تكون هذه المناطق غير معروفة ولذلك يجب أن تكون هذه الأجزاء تم دراستها سابقا بالطرق القياسية المثالية. ولذلك فإن PCR تكون غير فعالة فى إعطاء معلومات عن مناطق جديدة فى الطاقم الوراثى أى مناطق لم تدرس من قبل فما هو أهمية هذه الطريقة فى علوم الحياة؟ بالرغم من ذلك فإن هذه الطريقة ذات فوائد ومميزات كثيرة وأستخدامات كثيرة منها ما يأتى.

١ - يمكن تقدير ودراسة تركيزات ضئيلة من دنا :

PCR can be used to study minute quantities of DNA

يمكن إستخدام هذه الطريقة عندما تكون كميات أو تركيزات العينة منخفضة جدا سواء كانت العينة haploid أو عادية diploid. فى حالة العينة haploid فى حالة الحيوانات المنوية. يستخدم هذا الإختبار فى تقدير كميات أثرية من دنا حيث نجحت هذه الطريقة فى تكبير دنا الموجود فى الحيوان المنوي وقد يكون حيوان منوى واحد وبالطبع يحتوى على نسخة أحادية haploid copy للطاقم الوراثى للإنسان human genome. وهكذا تستخدم فى الكشف عن جرائم الإغتصاب الحساسية المطلقة لهذه الطريقة تمكننا من عمل تحليلات البيولوجيا الجزيئية على عينات تحتوى على كميا صغيرة جدا من دنا كما يمكن عمل تجارب التوطين القياسية standard cloning procedures. وهكذا فإن PCR يمكن أن يستخدم بكفاءة وفاعلية فى الطب الشرعى والتحليلات المطلوبة وهكذا يمكن عمل إختبارات بصمة الأصبع الوراثية genetic

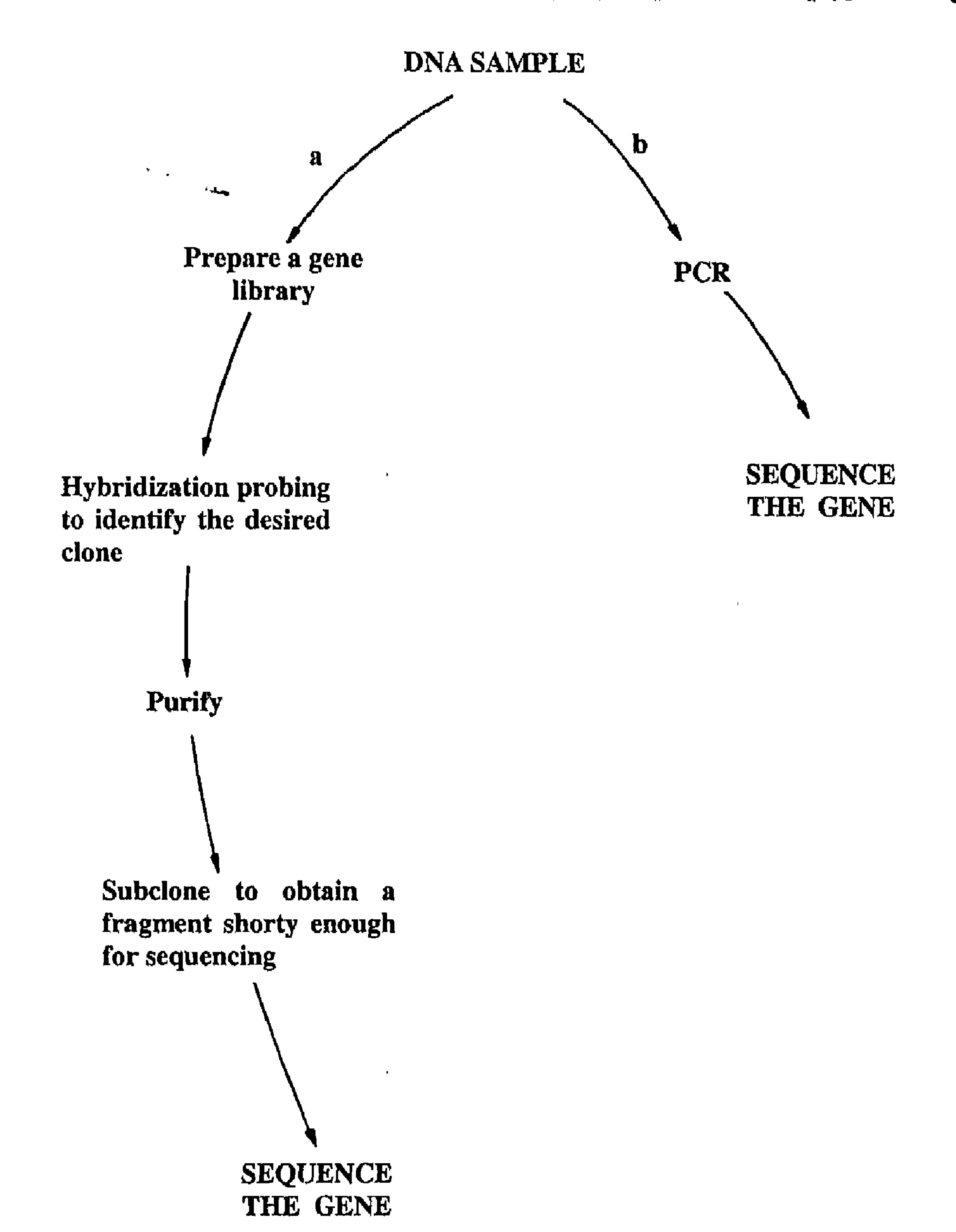
fingerprinting techniques وذلك فى حالة وجود شعرة واحدة أو لطخ الدم وبذلك تساعد الطب الشرعى فى تحديد هوية الجانى فى الجرائم. يمكن أيضا إستخدام PCR لتكبير دنا فى عظام الجانى أو المجنى عليه فى جرائم القتل. وعلاوة على ذلك تمكن من إجراء الإختبارات على عينات متحللة أو معفنة والتى يصعب عمل الإختبارات عليها بالطرق العادية. ومن أحسن الأمثلة لذلك أن التحليل للعظام المكتشفة فى Ekaterinburg تثبت أنها تنتمى إلى نيقولا الثانى Tsar Nicholas II وعائلته. وقال قائل أن هذا الإختبار أستعمل فى تنسيب الملكة فكتوريا الشهيرة ملكة بريطانيا وقال القائل أنه يوجد شك فى النسب والله أعلم.

أفادت أيضا هذه الطريقة فى تقدم علم الحفريات النباتية وعلم الحفريات الحيوانية وعلم الآثار حيث يمكن تحليل لدنا وذلك بعمل تتابع القواعد لعينات أثرية من دنا موجودة فى الحفريات أو الآثار. يستخدم هذا الإختبار فى تنسيب القدماء لبعضهم وذلك من عينات دنا موجودة فى عظامهم أو فى الموميات. أستخدم فى تنسيب وإيجاد أصل سكان أمريكا الأوائل وإنتقالهم عبر طرق هجرة عديدة والتى قادت إلى أستيطانهم الساحل الباسيفيكى. أستخدمت فى دراسة حفريات الحشرات وبقايا النباتات المدفونة فى العنبر (الكهرمان) amber عبر العصور الجيولوجية المختلفة عن طريق تحليل دنا.

٢ - إستخدام PCR فى التشخيصات الطبية :

PCR can be used in clinical diagnosis

تستخدم طرق RFLP القياسية فى التشخيص والتعرف على طفرات الإنسان والتى قد تقود إلى أمراض وراثية، ولكنها تستخدم فقط فى حالة الطفرات التى تنتج عنها إختلاف فى أطوال شظايا القطع سواء بالزيادة أو بالنقص لأن هذه الطرق تعتمد على ذلك. ولكن بعض الطفرات تكون خلاف ذلك حيث لاتؤدى إلى RFLP ولذلك فإن بعض الأمراض الوراثية لا يمكن إكتشافه بهذه الطريقة ولكنه يحتاج إلى تحليل لتتابع القواعد لإكتشاف الجين الطفرة (شكل ١٣٤).



شكل ١٣٤: مقارنة بين الطرق التقليدية والطرق المبنية على PCR للحصول على تتابع القواعد فى الجين من دنا الإنسان.

معنى ذلك أنه بالطرق التقليدية أنه لابد من تحضير مكتبة جينات لكل فرد ثم عزل وتحليل تتابع القواعد فى الكلون المحتوى على الجين المتطفر isolating and sequencing the clone containing the mutated gene. ولكن هذه الطريقة صعبة

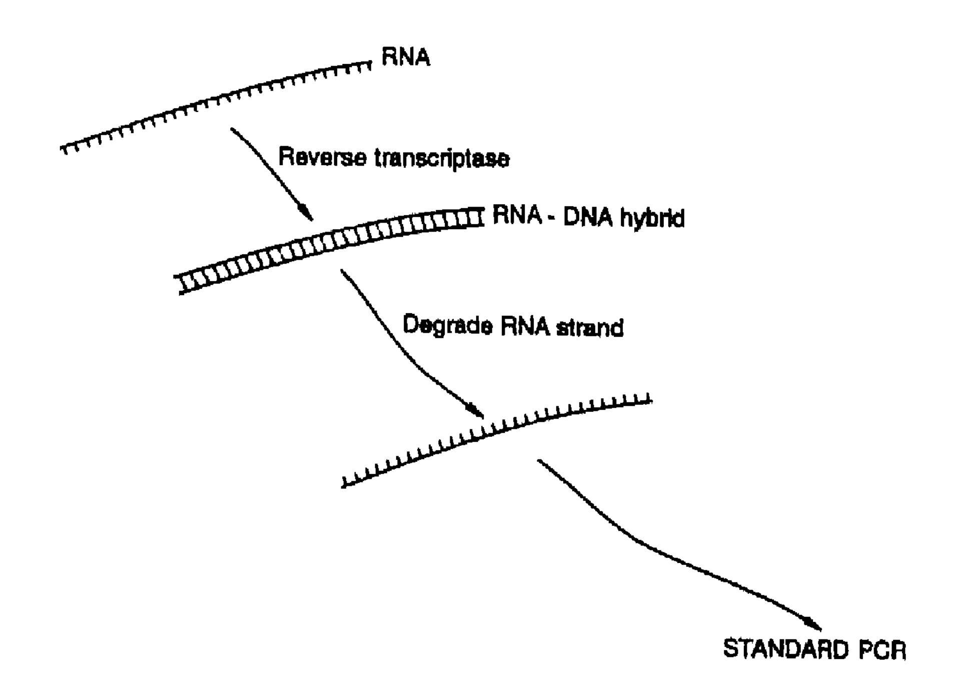
جدا وقد تكون مستحيلة وتحتاج إلى وقت كبير. ولكن بإستعمال PCR فإنها تكون طريقة بديلة سريعة تمكن من التعرف على تتابع القواعد بسرعة لعملية التكبير للجزء من الجينوم تحت الدراسة ويلى ذلك تحليل مباشر لتتابع القواعد فى نواتج عملية التكبير بواسطة PCR (شكل 134 b) بهذه الطريقة يمكن نسخ الطفرات بسرعة ولذلك يمكن التعرف على تشخيص الأمراض الوراثية بسرعة. كما أنها تسرع من أبحاث الأمراض الوراثية أى تقدم الأبحاث فى هذا الصدد حيث يمكن التعرف على طفرات جديدة فى الأمراض الوراثية.

تفيد هذه الطريقة أيضا فى التعرف على الأمراض الطفيلية وتشخيصها ومثال ذلك تكبير دنا الفيرس المسبب أمراض فيروسية للإنسان. أى تكبير دنا الفيرس وتحليله يفيد فى التشخيص السريع المبكر لهذه الأمراض الطفيلية الفيروسية قبل أيام أو أسابيع أو شهور قبل ظهور الأعراض وبالتالى يمكن علاجها قبل إستفحالها. ومثال ذلك أمراض السرطان الناتجة عن فيرس مثل سرطان الرقبة cervical cancer المتسبب عن فيروسات الإنسان المعروفة human papilloma viruses.

٣ - إستخدام PCR فى تكبير RNA رنا :

PCR can be used to amplify RNA

بالرغم من أن PCR تستخدم فى تكبير دنا فإنها تستخدم فى تكبير رنا، وفى هذه الحالة لابد من تحويل وقلب رنا إلى دنا تكميلى وحيد الحلزون single- standard c DNA وذلك بإستخدام إنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase. وبعد إضافة أنزيم النسخ العكسى يتم تحليل رنا بإنزيم مناسب ويتبقى دنا ثم يضاف بعد ذلك بادىء ثم إنزيم البلمرة *Taq* ليتم إتباع خطوات PCR تماما كما سبق فى الحالات العادية لهذه الطريقة (شكل ١٣٥).

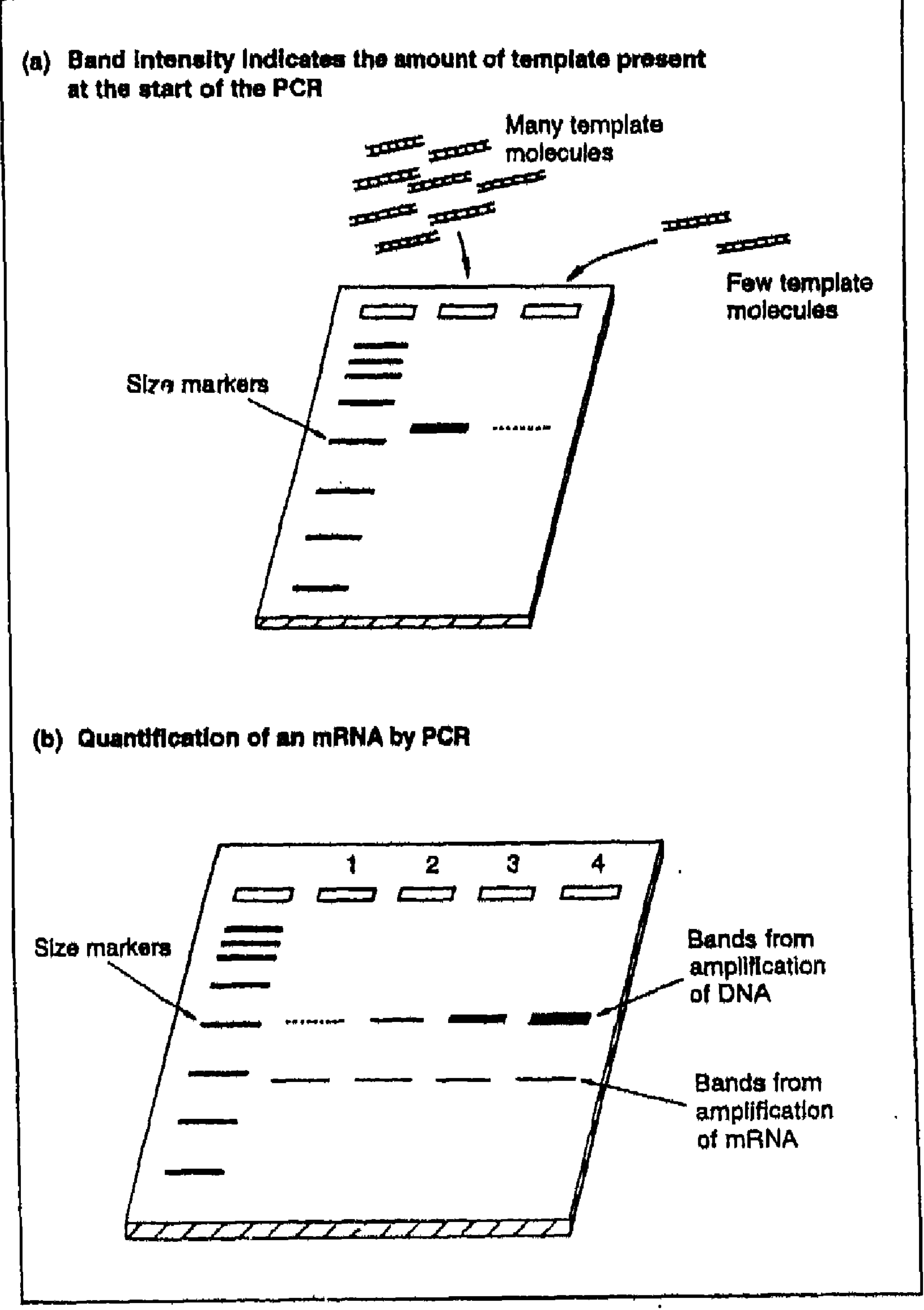


شكل ١٣٥ : نسخ عكسى لطريقة PCR (Reverse transcription- PCR).

أحد التطبيقات المفيدة لطريقة RT-PCR هو قياس التركيز النسبى لرنا رسول فى الأنسجة المختلفة أو فى نسيج واحد فى أزمنة مختلفة. حيث أن تركيز رنا رسول يعتبر إنعكاس لنشاط الجين الأبوى أو الأصلى، أى أنه كلما زاد تركيز رنا رسول كلما كان الجين نشط، وهكذا فإن التغير فى تركيز رنا رسول يوضح درجة نشاط الجين والتغير فى نشاطه أى التغير فى التعبيرعن نفسه. فى الماضى كانت تستخدم طريقة التهجين الشمالية northern hybridization لمستخلصات رنا للتعرف على تركيز رنا، ولكن تحتاج هذه الطريقة إلى كميات مناسبة من رنا، ولكن فى حالة وجود كميات أثرية من رنا رسول لايمكن تحليلها بهذه الطريقة ولكن يمكن تحليلها بطريقة PCR بسهولة. ولذلك فإنه يمكن دراسة الجينات ذات النشاط الضعيف أو الخاملة نسبيا حيث أننا نحتاج ذلك أحيانا بشدة. يمكن المقارنة بين تركيز رنا رسول فى عينتين حيث أن تركيز أى شدة وتركيز صبغ أشرطة رنا فى الأجاروز يعطى فكرة ومقياس لتركيز رنا فى العينات المختبرة (شكل ١٣٦ a) حيث أن الفكرة فى ذلك أن كمية الناتج من PCR يكون نسبى أى متناسب مع كمية رنا أو دنا الأصلى، أى كمية

أو تركيز العينة التى بدأ بها PCR. فكلما بدأنا بعينة مركزة يكون الناتج من PCR تركيزه أكبر والعكس صحيح. وهكذا يكون ناتج PCR دليل على تركيز أو كمية دنا أو رنا فى العينة. وهكذا ستختلف كثافة الحزم أى الأشرطة فى غروى الأجاروز agarose- gel بعد عمل عملية electrophoresis. وهكذا يمكن حساب الكميات النسبية من ناتج PCR ومثال ذلك أن نواتج تجربتين من PCR يمكن مقارنتهما وذلك بمقارنة تركيز الحزم bands (الشرائط) فى العينات التى تم عمل لها هجرة فى وسط غروى وهو agarose- gel (شكل ١٣٦ b) حيث يلاحظ أن التركيز فى حزمة أكبر من الحزمة الأخرى.

يمكن تقدير التركيز الحقيقى لرنا رسول عند بداية تجربة PCR وذلك بمقارنة تركيز الحزم مع سلسلة من الكونترولات الناتجة عن تكبير كميات أى تركيزات معلومة من دنا (شكل ١٣٦ b). ويكون ذلك فى منتهى الدقة لو أن تكبير دنا تم عمله فى نفس الأنابيب التى يحدث فيها RT-PCRs وبإستخدام نفس البادئات. وليكون ذلك ممكنا يجب إشتقاق رنا رسول من جين به إنترون أو أكثر. ولذلك تكون الشظايا الناتجة من دنا template DNA أى من تكبير دنا تكون أطول من الشظايا الناتجة من رنا رسول وهكذا تكون سرعة الهجرة مختلفة فى غروى الأجاروز ويكونا فى موقعين مختلفين أى منفصلين (شكل ١٣٦ b).

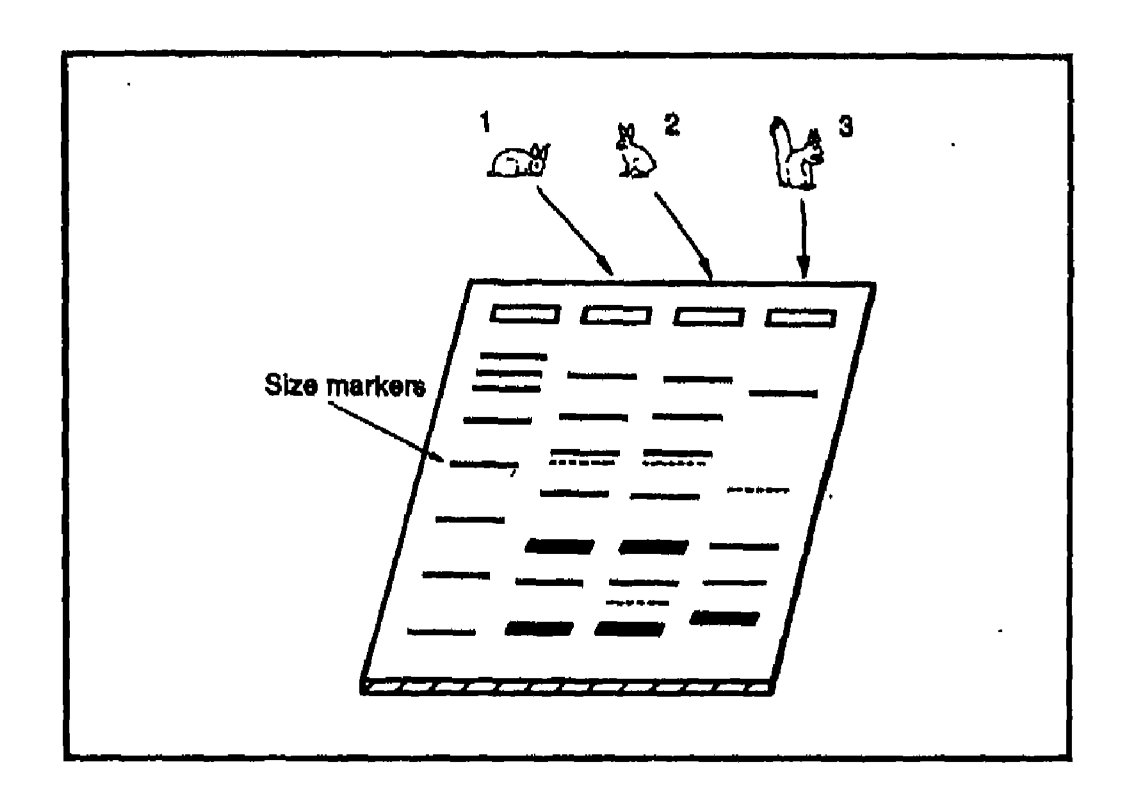


شكل ١٣٦: فى الشكل b تكون البداية بعينات تحتوى على كميات متساوية من رنا ولكن كميات متزايدة من دنا. يتم إشتقاق رنا رسول من دنا الجين المحتوى على انترون أو أكثر ولذلك يكون هذا المشتق من الجين أطول كما أن نواتج تكبيره أطول من النواتج المشتقة من رنا رسول ولذلك يحدث إختلاف فى موقعهم فى الأجاروز. الحارة ٢ بها تركيز متساو من دنا ورنا رسول ومعنى ذلك أن PCR تحتوى على عدد متساو من نسخ دنـا ورنا رسول لتتابع الهدف.

٤ - إستخدام PCR فى مقارنة أطقم وراثية (جينومات) عديدة:

PCR can be used to compare different genomes

سبق القول أن إستعمال بادىء primer أصغر من المعتاد غير مرغوب فيه بل مرفوض كما سبق شرحه. ولكن على العكس من ذلك فإن إستعمال هذه الطريقة مطلوب فى حالة الدراسات المتعلقة لتطور ولنشوء الأنواع والكائنات وتسلسلها من بعضها phylogenetical studies، لو أن تكبير عشوائى لدنا random amplification بواسطة بادئات صغيرة تم فصله على غروى الأجاروز بواسطة الهجرة فى وسط غروى فى مجال كهربائى يعطى فكرة عن التركيب الكلى للكائن الحى أى الطاقم الوراثى (جينوم) للكائن الحى إذا تم عمل ذلك لدنا الطاقم الوراثى. المقارنة بين طاقمين وراثيين (جينومين) لكائنين حيين لو أنهما نفس النوع أو نوعين مختلفين يمكن المقارنة بينهما بواسطة بادئات عشوائية random primers بإستخدام طريقة PCR. حيث أن كائنين متقاربين فى النشوء والتطور سيعطيان نفس شكل توزيع الشرائط على الجل banding patterns أو بأشكال متشابهة ولكنهما سيختلفان تماما فى حالة الكائنين المتباعدين (شكل ١٣٧) وتسمى هذه الطريقة بإسم طريقة تحليل دنا عديد الأشكال المكبر عشوائيا random amplified polymorphic (RAPD) DNA analysis. أستخدمت هذه الطريقة فى حالات عديدة ومنها حالة الفطر *Armilleria bulbosa* والذى أتضح أنه مماثل تماما فى التركيب الوراثى فى مساحة ٣٧ فدان تقريبا فى جزء من ولاية متشجان الأمريكية. ولكن عامة توجد تحفظات على هذه الطريقة RAPD حيث أن ترجمة نتائج هذه الطريقة معقدة جدا وحاليا لا يوجد إتفاق على كيفية التعامل مع هذه البيانات ومدى دقتها. عامة تستخدم هذه الطريقة فى دراسات على الكائنات الحية الدقيقة ومنها الفطريات ومنها الفطريات البازيدية الراقية ومنها الهرمونات التى تكون سموم مثل بعض أنواع الجنس *Amanita* وعلى الكائنات الراقية مثل الحيوان كما فى المثال السابق وأيضا على النباتات ومنها الإقتصادى مثل القمح.



شكل ١٣٧ : طريقة تحليل RAPD. حيث أن مجموعة من العلماء إختبروا النظرية التى تقول أن squirrel عن أرنب له ذيل غير معتاد ويأكل البندق واللوز الخ nuts. تم عمل طريقة RAPD على أرنبين (الحارة١ والحارة٢) و squirrel (حارة٣). أعطى الأرنبين نفس النظام للشرائط (الحزم) نفس التوزيع ونفس الموقع وتقريبا نفس العدد بينما أعطى squirrel نظام شراط مختلف. وهكذا إتضح أن الأرنب مختلف عن squirrel. وهكذا حل هؤلاء العلماء لغز هذه النظرية بعد ثبوت خطئها.

أحد المقتطفات عن أهمية إستخدام PCR:

ذكر فى جريدة الأهرام يوم الأحد الموافق ١٠ فبراير ٢٠٠٢ مايلى:

٢٨٠٠ قتيل آخر إحصائية لضحايا انهيار برجى مركز التجارة

نيويورك- أ. ب: أعلن مسئولون أمريكيون أن عدد ضحايا انهيار برجى مركز التجارة العالمى بنيويورك عقب اعتداءات ١١ سبتمبر انخفض إلى ٢٨٠٠ شخص وذلك عقب نحو خمسة أشهر من عمليات رفع الأنقاض والبحث وإجراء الاختبارات، مشيرين إلى أن هذه الحصيلة ليست نهائية بعد أونها يمكن أن تواصل انخفاضها.

وأوضحوا أن القائمة الأولى للضحايا والتى تضمنت أسماء ٦٧٠٠ شخص

تقلصت بمرور الوقت وبتقدم التحقيقات حول هوية الضحايا والمفقودين واكتشاف الكثير من الأخطاء فى القوائم الأولى، وأعرب المسئولون عن اعتقادهم أن الحصيلة النهائية للضحايا ستنخفض كثيرا عند الانتهاء من التحقيقات ورفع الأنقاض، ومضاهاة عينات الـــ((دى، إن. ايه)) بأشلاء الضحايا.

وأشاد خبراء إلى أن العمل الشاق والمضنى الذى يقوم به رجال الشرطة ومكتب عمدة نيويورك للتحقق من الأسماء، ومراجعة طريقة كتابة كل اسم للتأكد من عدم تكرار أسماء الضحايا لا يمكن أن يقارن بأى جهد بذله المحققون فى عمليات إحصاء الضحايا وتحديد هوياتهم.

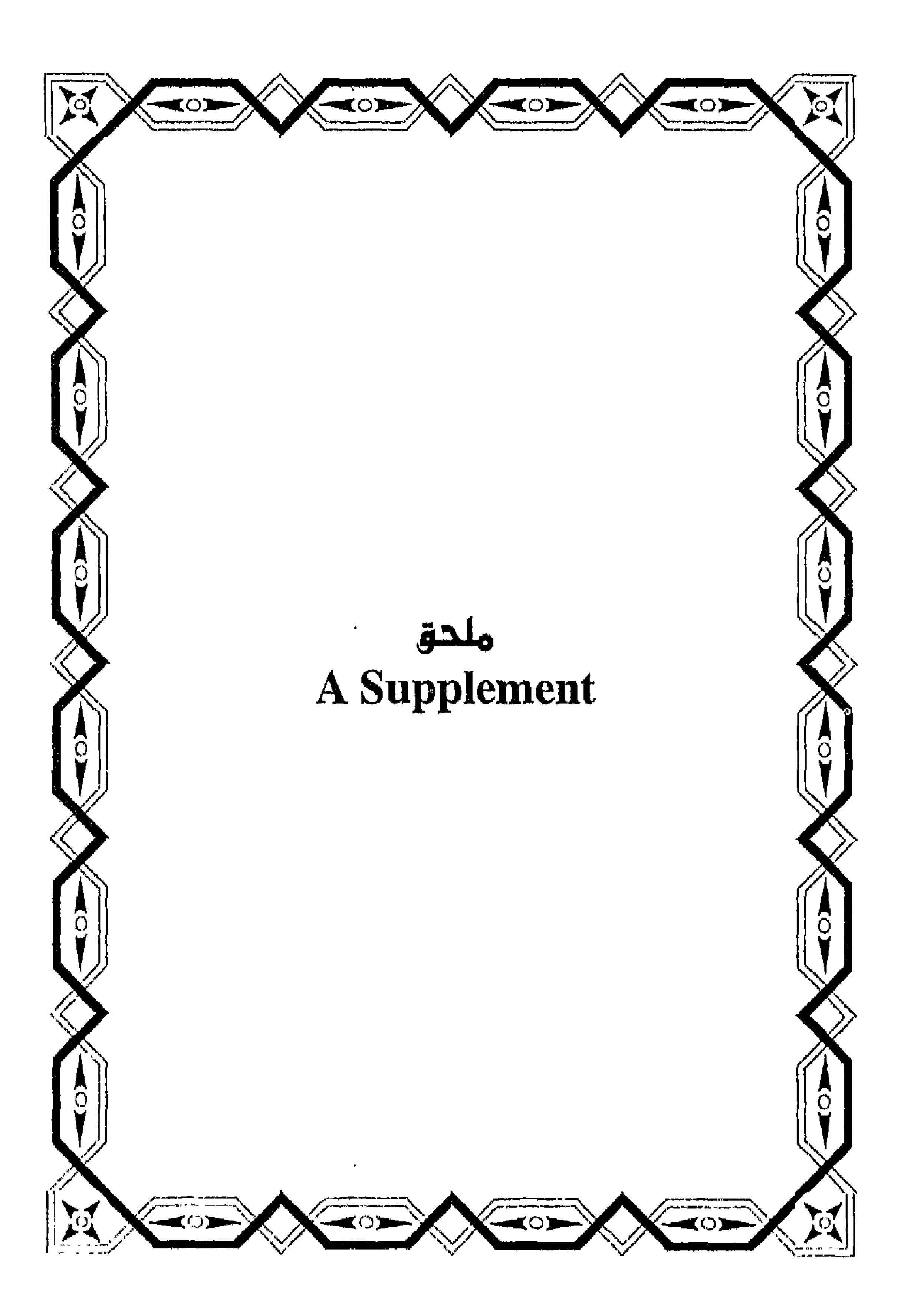
ومن ناحيته أوضح شريس فوستر من مكتب عمدة نيويورك أن فريق البحث أمضى أياما متوالية بلانوم لتتبع الأشخاص الذين سجلوا فى عداد المفقودين من رعايا القنصليات الأجنبية بالولايات المتحدة، وأضاف أنه مازال هناك ٢٨ شخصا يعتبرون فى عداد المفقودين من مجمل قائمة ضمت ١٩٠٠ من رعايا القنصليات الأجنبية.

وأوضح أنه فيما يتعلق بالأمريكيين، فإن نحو ٧١٢ شخصا تم تحديد هوياتهم من اجراء فحوصات ((دى. ان. ايه)) عليهم، بينما طلبت أسر نحو ١٩٣٢ ضحية استخراج شهادة وفاة من المحكمة لأن كل الدلائل تؤكد أنهم كانوا حتما داخل مكاتبهم بمركز التجارة عند اصطدام الطائرتين الأولى والثانية.

وأكد المسئولون أن العمل مازال طويلا إذ أن مكتب الاختبارت الطبية سيعمل على تحديد هوية باقى الضحايا بمطابقة عينات الـــ دى. ان. ايه التى حصلوا عليها من اسر المفقودين على نحو ١٤ الف جزء من أشلاء الضحايا الذين تم انتشال بقاياهم.

الرئيس الأمريكى و PCR:

أثبتت تجارب PCR أن أحد رؤساء الولايات المتحدة الأمريكية السابقين وهو توماس جيفرسون Thomes Jefferson أنه أب لطفل غير شرعى من عبدته السوداء His Slave وأسم هذه العبدة هى سالى هينجس Sally Henninges.



ملحق
A Supplement

التحويرات فى تركيب دنا
Modifications In DNA Structure

التركيب الذى إكتشف بواسطة وطسن وكريك عبارة عن بيتا دنا β-DNA والذى يمثل الملح الصوديومى لدنا فى ظروف ذات رطوبة مرتفعة. ولكن جزيئ دنا يمكن أن يكون له بعض الإختلافات فى تركيبه وشكله لأن سكر دى أوكسى ريبوز مرن والرابطة الجليكوسيدية -C-N- لها قدرة على الدوران. ومن المعروف أن روابط الفيورانوز furanose لها تركيب سهل التغضن puckered conformation. ولكن توجد أنواع أخرى وهى A و Z (شكل ٢).

عندما يكون متميأ جزئيا يأخذ الشكل A. وفى حالة الشكل A فإن تزاوج القواعد لا يكون بزوايا قائمة على محور الحلزون وبدلا من ذلك فإنها تنحرف وتميل ٢٠ درجة عن المستوى الأفقى وأيضا المسافة بين القواعد المتزوجة تقل بدرجة طفيفة ومع وجود ١١ زوج قواعد لكل لفة حلزون بدلا من ١٠,٤ زوج قاعدة الموجود فى الشكل B ولكل لفة حلزون مزدوج تحدث فى ٢,٥ نانومتر بدلا من ٣,٤ نانومتر وقطر الجزيئ يصبح ٢,٦ نانومتر بدلا من ٢,٤ نانومتر الموجود فى الشكل B. يتكون الشكل A عند الإستخلاص بالمذيبات مثل الإيثانول. أهمية النوع A على مستوى الخلية هو أن رنا المزدوج RNA duplexes وأيضا المزدوج دنا رنا DNA/RNA duplexes والتى تتكون أثناء عملية النسخ فإنها تشبه النوع A فى تركيبها.

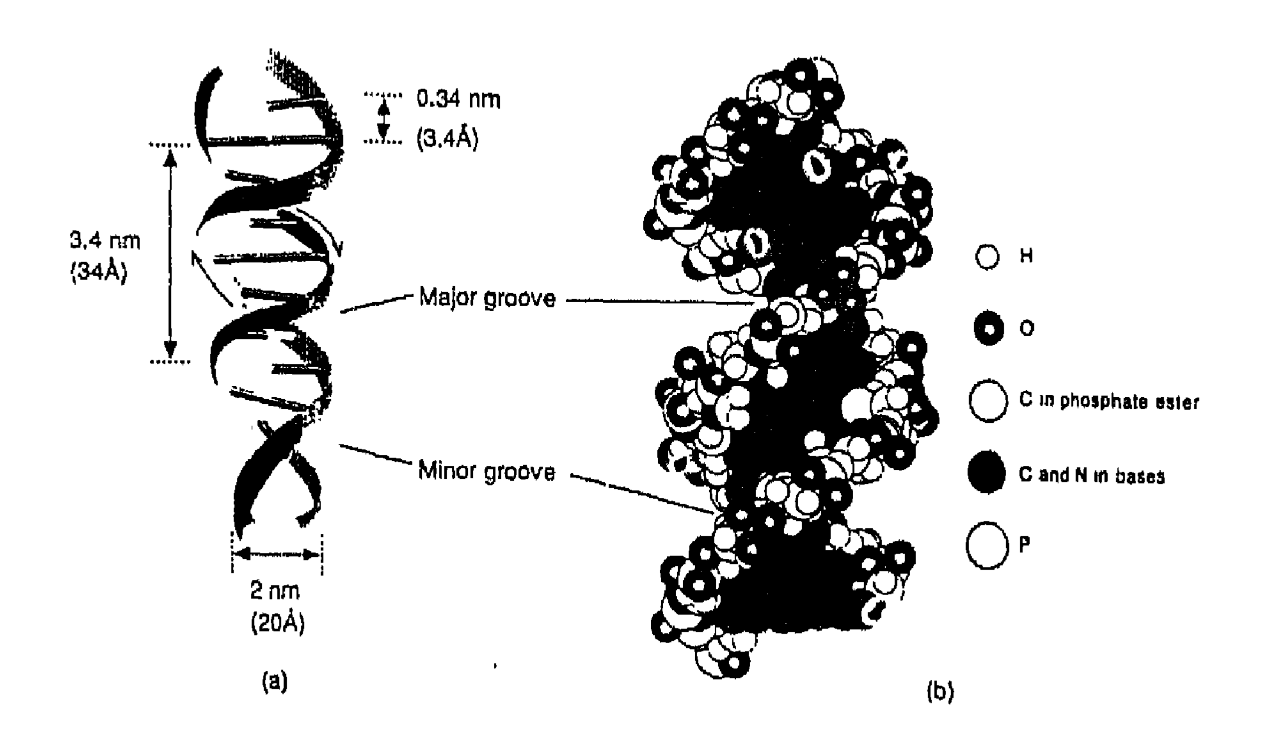
أما النوع Z من دنا والذى يسمى بذلك نتيجة لشكله الزجزاجى zigzag conformation والذى يشتق من النوع B. القطر فى جزيئ Z يكون ١,٨ نانومتر= (D 1.8 nm) والذى يكون أرفع وأضيق من النوع B وهو عبارة عن ٢,٤ نانومتر (D = ٢,٤ nm) كما أنه يكون يسارى الحلزنة وله ١٢ زوج قاعدة لكل لفة حلزون، وكل لفة تحدث فى ٤,٥ نانومتر بالقارنة فى حالة B والتى تكون ٣,٤ نانومتر. وفى

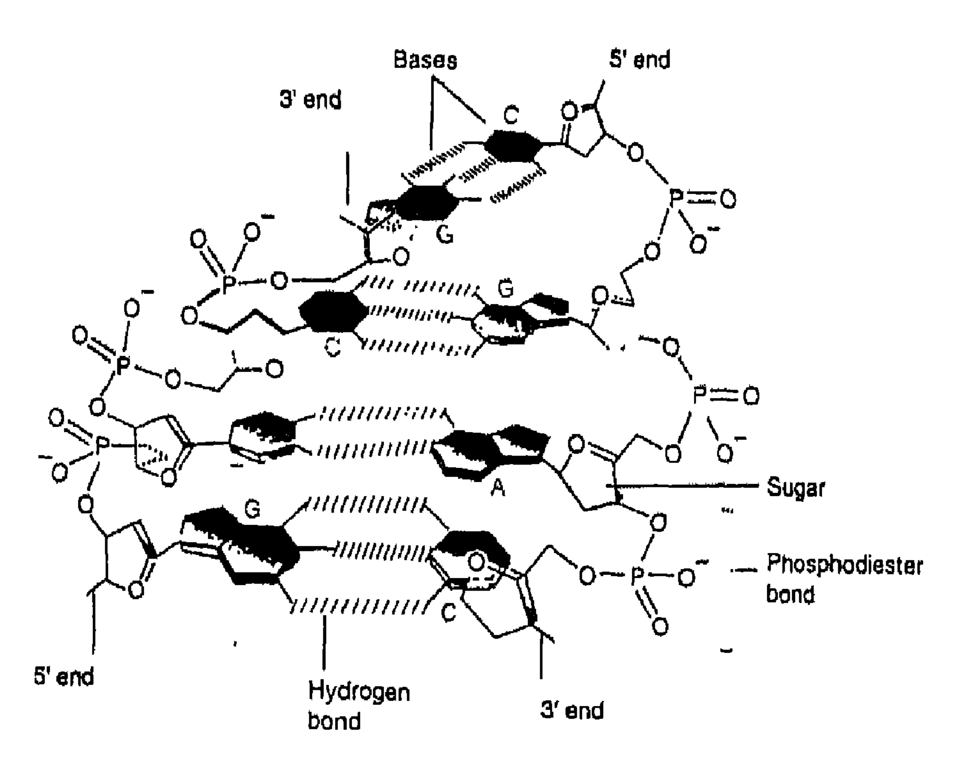
حالة شظايا دنا أى أجزاء صغيرة من دنا والتى يحدث فيها دائما تتابع من بيورينات وبيريميدينات معينة وعلى الأخص التركيب التالى CGCGCG عادة تكون قابلة لأخذ الشكل Z. ترتيب القواعد والحلزنة اليسارية تعطى شكل الجزيئ شكل مسطح ولا يوجد به شقوق grooves كبرى أو صغرى. عادة الأجزاء من دنا الغنية بتتاعات كثيرة من GC أى بتكرارية عالية تكون قابلة للإلتصاق بأنواع خاصة من البروتينات والتى تبدأ أو تختم عملية النسخ. بعض العمليات الفسيولوجية مثل عملية إدخال الميثيل أو الحلزنة الزائدة السالبة negative supercoiling تسبب ثبات الشكل Z.

فى بعض الحالات مثل درجة حموضة عالية فإن أجزاء طويلة نسبيا من سلسلة عديد البيورين polypurine تكون مرتبطة بروابط إيدروجينية بأجزاء طويلة من سلسلة عديد البيريميدين polypyrimidine ولذلك يتكون الحلزون الثلاثى triple helix ويسمى هذا النوع بإسم النوع H أى H-DNA (شكل ٣). يحدث التزاوج بين القواعد بطريقة غير معتادة تسمى هوجستون لتزاوج القواعد Hoogsteen base pairing (شكل ٤) والتى تحدث دون المساس بالطريقة العادية لتزاوج القواعد لواطسن وكريك. غير معروف أهمية أو وظيفة النوع H للخلية حتى الآن. يمكن أن يكون للنوع H دور فى إعادة الإرتباط الوراثى genetic recombination.

عامة حلزون دنا أحدهما يعطى علامة سالبة minus والآخر يعطى علامة موجبة plus. ورنا المتكون من دنا السالب هو الذى تكون أثناء عملية النسخ. النوع B هو الأكثر شيوعا ويسمى B- DNA in vivo. توجد أشكال وأنواع أخرى لدنا مثل A و C و Z وهذه الأنواع يمكن أن تتكون عندما تعرض جزيئات دنا لدرجة رطوبة نسبية مختلفة كما فى الجدول (جدول ١). النوع A و B و C يكون يمينى التوجيه right handed DNA ولكن فى بعض الظروف أو فى تكرارت معينة أو فى وجود motifs فإن توجيه دنا يكون يسارى التوجيه وهو النوع Z. الشكل Z خلق أولا معمليا ولكن يعتقد البعض أنه غير موجود بالطبيعة ويعتقد البعض خلاف ذلك كما سبق شرحه فى الجزء السابق. هذه الأشكال المختلفة لدنا توضح أنه ليست جزيئ ثابت static ولكنه

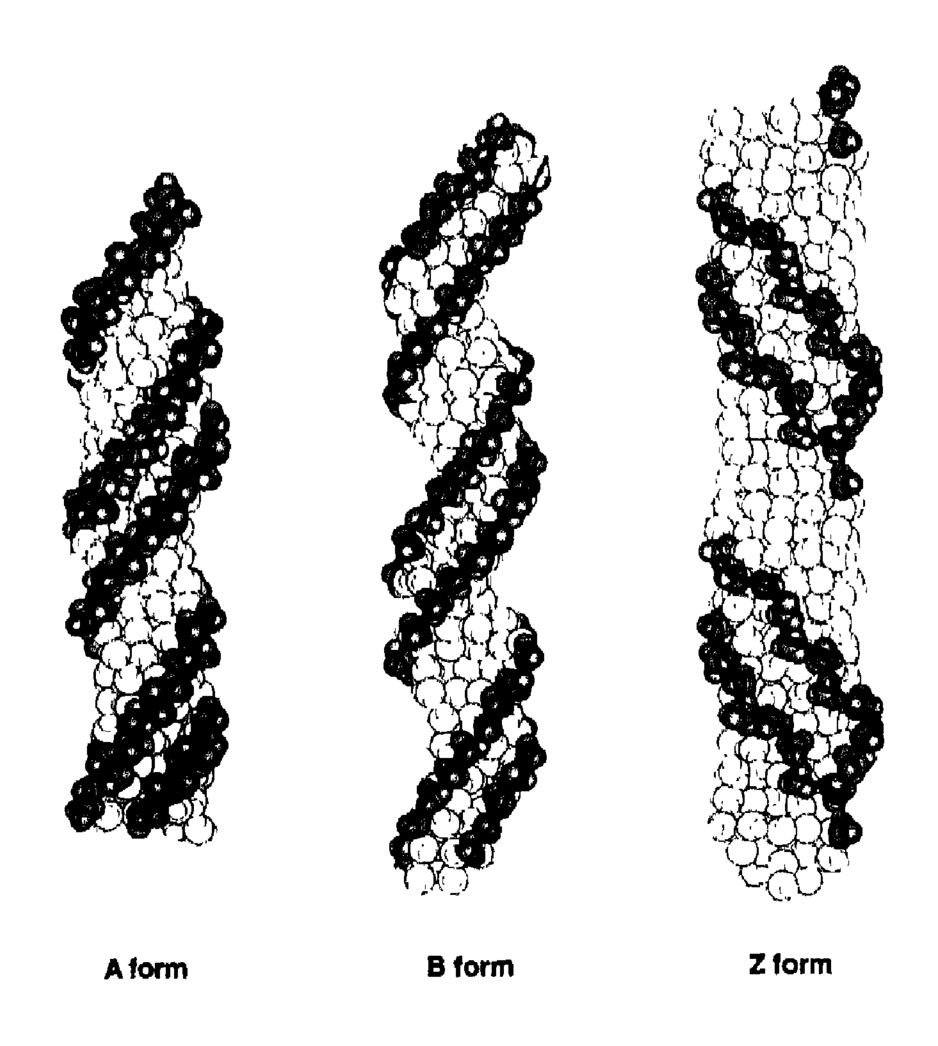
متغير بإستمرار dynamic and constantly in flux وأنه يمكن أن يكون ملتف أو منحنى أو محرف أو مشوه. أمكن تخليق الأشكال A، C، Z معمليا.





شكل ١ : (a) تركيب دنا تخطيطى، (b) تركيب دنا طبيعى ، (c) شكل مكبر لشظية من دنا.

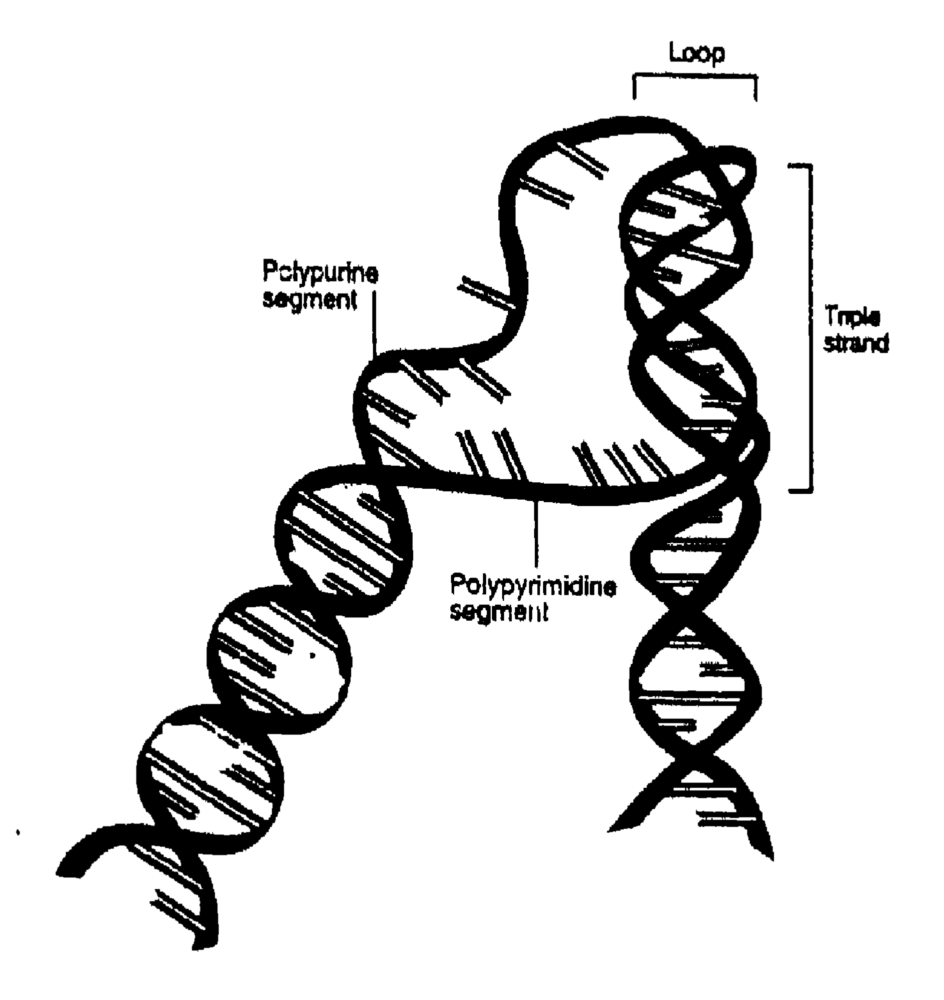
Chapter Sixteen NUCLEIC ACIDS



شكل ٢: الأنواع المختلفة لدنا.

جدول ١: الأنواع المختلفة لدنا

DNA form	% humidity	Helix direction	Base/turn helix	Helix diameter
B	92%	RH	10	19
A	75%	RH	11	23
C	66%	RH	9.3	19
Z	(pu- py)n	LH	12	18



شكل ٣: دنا H-DNA H.

شكل ٤: Hoogsteen base pairing.

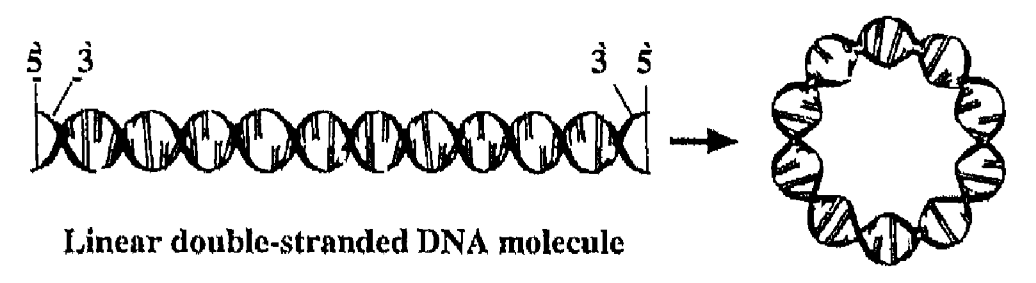
الحلزنة الزائدة لدنا
DNA Supercoiling

لفهم ذلك تصور جزيئ دنا شريطى أو خيطى يوضع على سطح مسطح وعند تقارب النهايتين لبعضهما فإنه يحدث إلتحام بينهما وتتكون حلقة غير قابلة للتغضن (شكل ٥) ولأن الإلتحام حدث بدون حدوث under or over winding يقال أن الحلزون مسترخى أو مرتاح relaxed أى لا يوجد ضغط عليه ويستمر مسطح على السطح. عدد مرات عبور كل خيط أى كل حلزون للآخر يسمى رقم الإرتباط linking number ويرمز له بالرمز L. عدد مرات لفات الحلزون تسمى twist ويرمز لها بالرمز T. وعلى سبيل المثال لو أن هناك ٢٦٠ زوج قاعدة فى جزيئ دنا حلقى مسترخى أى غير مضغوط فإن L تكون ٢٥ أى تكون ١٠,٤/٢٦٠ وتكون T هى ٢٥. يتغير عدد رقم الإرتباط فقط عندما يحدث كسر فى الرابطة التعاونية فى العمود الفقرى لحلزون أو حلزونى دنا ثم يحدث بعد ذلك إعادة إلتحام الرابطة. يختلف حدوث twist بحرية. يمكن لدنا الحلقى أن يحدث له عقد held و twisting قليل من المرات فيأخذ شكل الفيونكة (شكل ٥). عند وضع الشكل الأخير (الفيونكة) على سطح مسطح فإنه يدور لكى يتخلص من twist. ماذا يحدث لو قطعنا هذا الجزء قبل twisting (الإنزيمات التى تقوم بهذا الدور فى الخلايا الحية تسمى topoiso merases). بالإضافة إلى تغيير رقم الإرتباط فإن هذه العملية الأخيرة تغير من عدد الطى أو التضفير writhing number والذى يرمز له بالحرف W (عدد التضفير أو الحلزنة الزائدة superhelical turns فى جزيئ ثلاثى الأبعاد three dimensional conformation وكما فى حالة العدد T فإن عدد W للجزيئ الواحد يمكن أن يتغير. العلاقة بين هذه القيم يمكن وصفها بالمعادلة الآتية:

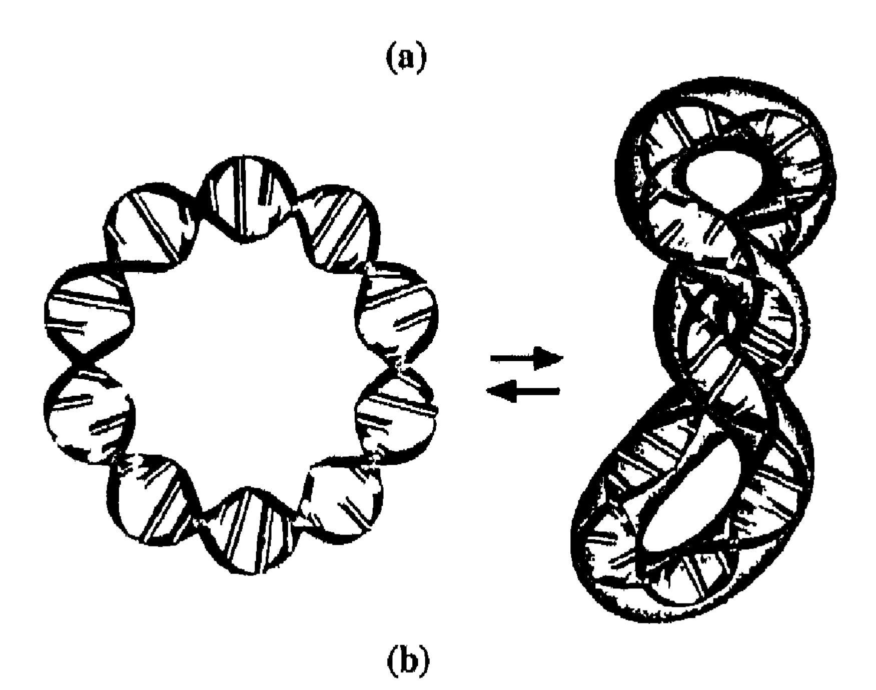
$$L = T + W$$

عند تغيير الرقم الخاص بالحرف L ويكون هذا التغير بالمقارنة بحالة الإسترخاء للجزيئ فإن الغط الذى أدخل على الجزيئ يتم تجزئته بين قيم T، W. التغيرات الديناميكية فى شكل الجزيئ والتى تحدث أثناء التضاعف والنسخ تكون عبارة عن قيم متغيرة ثابتة لكل من T، W. فى حالة الأشكال الثابتة لدنا المعبأ packaged DNA فإن قيمة T تكون ثابتة لينتج عنها تزاوج قواعد عادى وتتحرر من جميع الضغوط بواسطة الحلزنة الزائدة.

عندما يكون دنا underwound تكون T أكبر من L ويحدث إلتفاف إلى اليسار ليخفف من الضغط وينتج عن ذلك حلزنة زائدة سالبة وحيث تكون W سالبة. عندما يكون دنا over wound تكون L أكبر من T ويحدث إلتفاف إلى اليسار ليخفف من الضغط وينتج عن ذلك حلزنة زائدة موجبة positive supercoiing results وحيث تكون W موجبة. وفى حالة عندما يكون دنا زائد الحلزنة السالبة فإنها تلتف حول نفسها لتكون حلزنة زائدة من نوع interwound أى interwound supercoil. فى حالة الحلزنة الزائدة الموجبة لدنا والتى تحدث عادة عندما تحدث حلزنة لدنا حول القلب البروتينى core protein لتكون حلزنة زائدة من نوع toroidal أى toroidal supercoil (شكل ٦). عندما يتم ممارسة ضغط على دنا الزائد الحلزنة السالب ليصبح فى مستو واحد فإن T تنخفض ليصبح مساوية لـــ L. أثناء تضاعف دنا وتكراره فإن topo isomerases تقطع دنا ويختفى الضغط torsional stain ولذلك فإن تضاعف دنا يبدأ بعد ذلك مباشرة. الحلزنة السالبة لدنا تشرح قدرات بعض تتابعات القواعد المعينة لدنا فى تكوين الأشكال الصليبية ودنا H. ومما هو جدير بالذكر أن مما سبق شرحه على الكروموسوم البكتيرى ولكن يمكن تطبيقه أيضا على دنا الخيطى أى الشريطى الموجود فى أنوية الكائنات الحقيقية النواة. عامة كسر الرابطة phosphodiester ثم إعادة تكوينها تسبب تحويل حلقة دنا المرتخية إلى شكل زائد الحلزنة سالب. يمكن تخفيف الضغط على الجزيئ الموجود فى الحالة الأخيرة أى الجزيئ زائد هذا الشكل إلى الشكل الحلقى كما فى الشكل (شكل ٧).

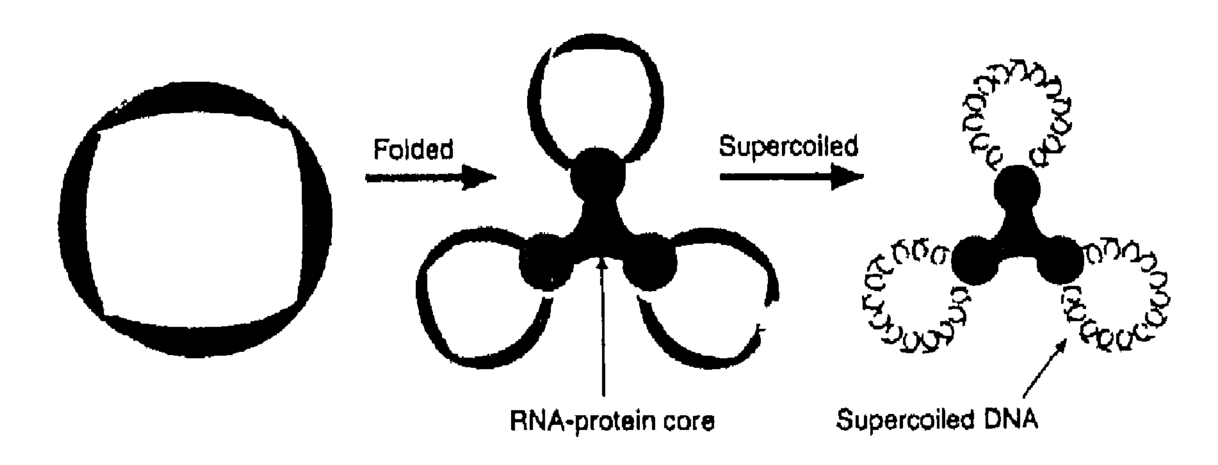


(a)

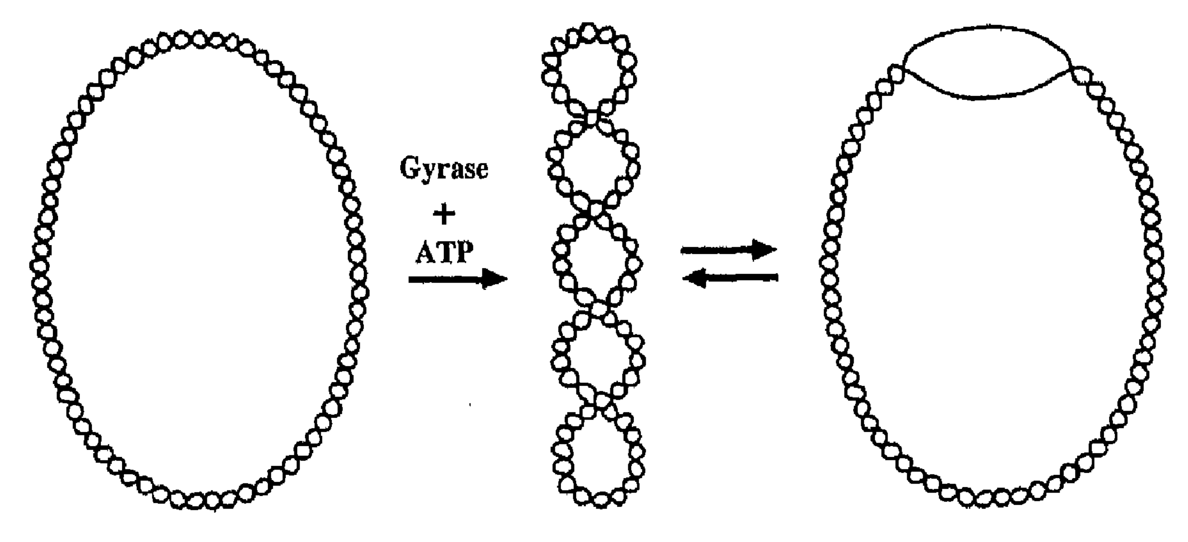


(b)

شكل ٥ : (a) رقم الإرتباط لدنا الحلقى المسترخى (الغير مضـــغوط) هـــو ١٠، (b) حدوث twisting لدنا المسترخى (الغير مضغوط) ليعطى شكل الفيونكه. عند زوال هذه الحالة يعود إلى الشكل الحلقى العادى أى من الفيونكه إلى شكل حلقى.



شكل ٦: كروموسوم بكتيرى فى إ. كولاى يلتوى وينطوى حول القلب الــبروتينى الرانى ثم تحدث عملية الحلزنة الزائدة.



شكل ٧: (a) جزيئ دنا مرتخى، (b) كسر الرابطة ثنائية الأستر الفوسفورية وإعـــادة تكوينها يسبب حدوث حالة الحلزنة الزائدة فى الجزيئ، (c) فصل الحلـــزونين فى جـــزء صغير يخفف الضغط على الجزيئ ويصبح حلقى.

دومينات البروتينات
Protein Domains

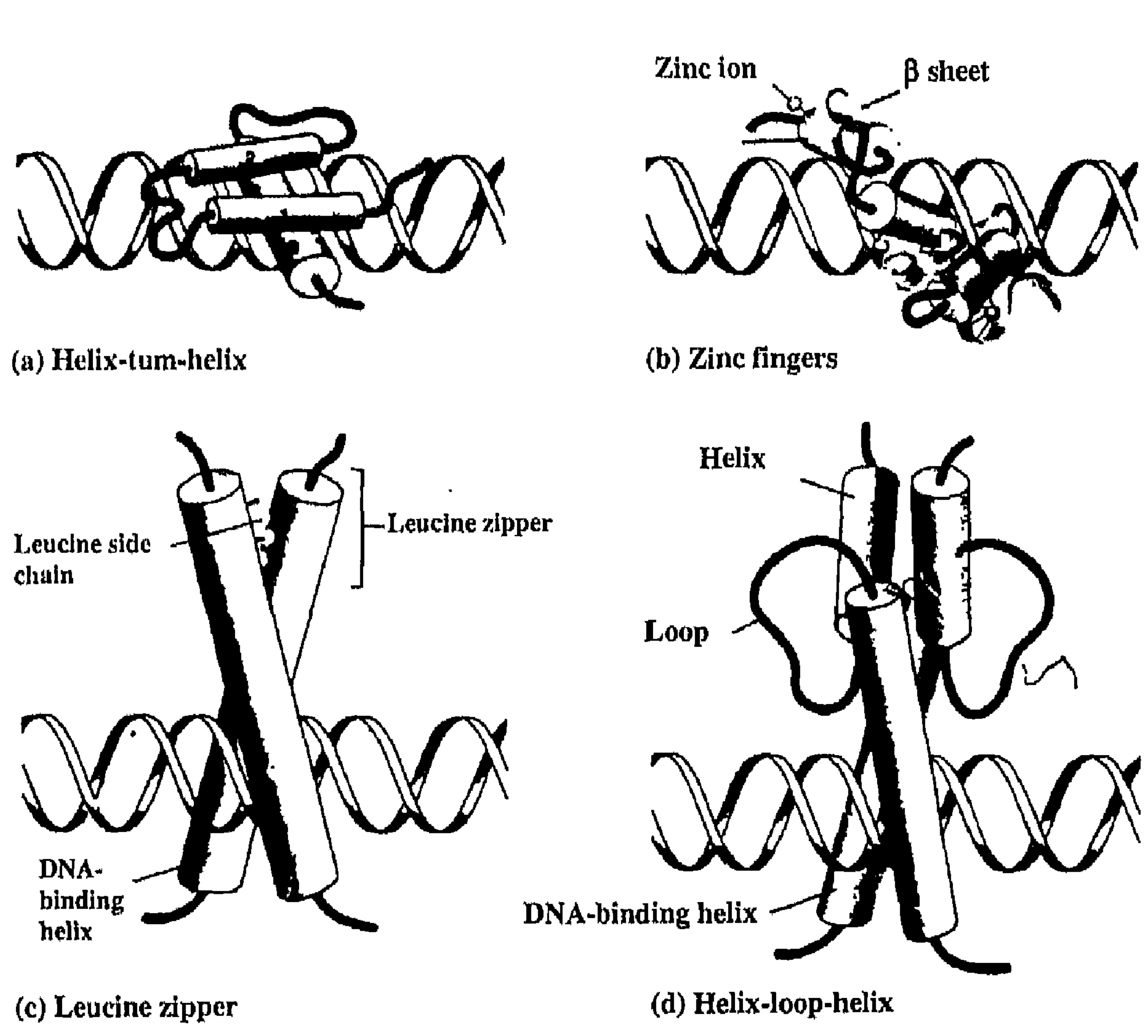
تحتوى البروتينات الحبيبية الكبيرة **globular proteins** (أكثر من ٢٠٠ حامض أمينى) على عديد من تركيبات دومينات **domains**. تعرف الدومينات بأنها أجزاء مستقلة غير معتمدة من ناحية التركيب **structurally independent segments** ولها وظائف معينة محددة أى أنها بروتينات وظيفة ومن هذه الدومينات مايأتى (شكل ٨).

١ - دومين يسمى **EF** والذى يتكون من حلزون- حلقة- حلزون ويلتحم بالذات بكاتيوم الكالسيوم **helix- loop- helix configuration**.

٢ - دومين يسمى أصبع الزنك **zinc finger motif** والذى يوجد عادة فى دنا المرتبط بالبروتين. دنا المرتبط بالبروتين عادة يحتوى عديد من أصبع الزنك وكل منها يمكن أن يقوم بعمل التفاعل بين البروتين ودنا. الحامض الأمينى سستئين **cysteine** تعتبر مواقع الإرتباط لأيونات الزنك.

٣ – دومين سوسته الليوسين leucine zipper ويعتبر أيضا مساعد على ربط دنا بالبروتين. ومقابض على سوسته الليوسين knobs on leucine zipper تمثل سلاسل جانبية لليوسين.

٤ – دومين حلزون– لفة– حلزون Helix- turn- helix أى حلزون من دنا ويتواجد مع بروتين وهذه البروتينات توجد على بعضها خلف خلاف كما فى الشكل رقم a وهذه البروتينات أرقامها ١، ٢، ٣ أى لفة.



شكل ٨: الأشكال المختلفة لدومينات البروتين.

مزارع الأنسجة فى الحيوان والإنسان
Animal and Human Tissue Cultures

تستخدم بعض المحاليل لزراعة الأنسجة لفترات قصيرة **short- term work** ومن هذه المحاليل **Young's** ،**Tyrode's** ،**Locke's** ،**Meng's** ،**Da Jalon's** وكثير منها مشتق من محلول **Ringer's** وهو أول محلول يتم عمله لهذا الغرض. أكثر المحاليل شيوعا هو **Kerbs- Ringer bicarbonate**. وتستخدم البيكربونات لضبط الأيونات فى سيرم الثدييات. هذه المحاليل تحتوى تركيزات مختلفة من أملاح رئيسية وهى كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم وفوسفات البوتاسيوم. وكبريتات المغنسيوم وكلوريد الكالسيوم وبيكربونات الصوديوم.

ضبط تبادل الغازات وأيضا **PH** فى البيئات هام خاصة فى حالة زراعة الأنسجة لفترات طويلة. تستخدم بيئة بها منظم هو عبارة عن بيكربونات بتركيز ٣٠ مللى جزيئى وتوجد فى جو أى هواء به ٥% ك أ٢ وذلك لضبط **PH** بين ٧,٣ – ٧,٥. صبغة أحمر الفينول **phenol red** والتى لها لون أحمر برتقالى عند هذا الـــ **PH** تستخدم كدليل على رقم **PH** المطلوب ولذلك عادة توضع فى البيئة. أما البيئات التى تحتوى محاليل منظمة أيونية **zwitterionic buffers** مثل **Hepes** لا تحتاج هذه المعاملة. أيونات الكالسيوم هامة فى حالة نمو الخلايا فى حالة **anchorage- dependent cells** ولكنها تستبعد تماما فى حالة مزارع المعلقات **suspension cultures**. توجد فى البيئات أيضا فيتامينات ومصادر للكربون وأحماض أمينية وبروتينات ومن أمثلة البيئات محددة التركيب أى معروفة التركيب بالتركيزات مثل بيئة **Delbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)** وأيضا بيئة **Ames medium** وأيضا بيئة **Mc Coy's 5 A medium**. إستخدم بيئات خالية من السيرم **serum- free medium (SFM)** تكون هامة عند دراسة تأثير الهورمونات وعوامل النمو على تكشف الخلايا. يوجد مدى من أنواع **SFM** يباع تجاريا وتحتوى بعض منها على مكونات السيرم النقية. هذه البيئات باهظة التكاليف.

فى حالة البيئات الغير محددة كيماويا chemically undefined medium فإنها تحتوى عادة على السيرم أو البلازما. يحتوى السيرم على عوامل نمو هامة مثل شبيه الإنسولين insulin- like growth factors (IGF) وعوامل النمو للبشرة (EGE) epidermal growth factor أو عامل النمو platelet- derived growth (PDGF) factor platelet، وهذه البيئات هامة فى حالة زراعة الأنسجة المفصولة لمدد طويلة والتى تتشكل بدرجة كبيرة. يضاف للبيئات مضادات حيوية لتمنع التلوث بالكائنات الحية الدقيقة ويتم تعقيمها بالفلتر أى التعقيم بالترشيح بتركيزات تتراوح من ٢,٥ إلى ١٠٠ ميكروجرام لكل سم٣. أغلب البيئات توجد فى صورة سائلة ولها مدة معينة expiry date عند حفظها فى الثلاجة. بعض البيئات تباع فى صورة مسحوق ولذلك تزداد فترة تخزينها خاصة عند حفظها بالثلاجة. يجب إختبار البيئة قبل إستعمالها عند كل إختبار بإختبار جزء صغير منها وذلك عند إستخدامها فى تجارب حساسة أو حرجة.

عند إستخدام أنسجة مفصولة excides tissue فإنها عادة تكون من خلايا مختلفة ويمكن أن تصنف تبعا لنشأتها من الجينين embryonic origin من حيث mesenchyma or haemopoitic embryonic origin من أمثلة الخلايا المنزرعة الماكروفاجات macrophages، Tand B lymphocytes، Polymor phonuclear leukocytes. عامة الدراسات الأولية الرائدة أثبتت أن نمو الأنسجة يمكن حدوثه in vitro معمليا على بيئات معقمة تحتوى أملاح وكربوإيدرات وفيتامينات وأحماض أمينية وسيرم. يمكن تصنيف الخلايا الحيوانية إلى مجموعتين، فى المجموعة الأولى تبقى الخلايا حية فقط عند إلتصاقها مع بيئة صلبة ومثال ذلك diploid fibroblast cells والمجموعة الثانية هى الخلايا التى يمكن أن تتكاثر وتنمو كمعلقات proliferate as suspensions مثل خلايا الإنسان المكونة للأورام human tumor cells وخلايا He La وأيضا hybridomas. الخلايا المعزولة حديثا من خلايا غير مكونة للأورام فإنها تظهر حالة الإعتماد التثبيتى anchorage dependence عند

النمو in vitro وذلك عند إلتصاقها بسطح إما أن يكون خلايا أخرى أو بلاستيك أو جيلاتين أو collagen ونادرا مايكون زجاج. أما فى حالة primary cell lines والتى تنشر أى تفرد على سطح على هيئة طبقات مفردة monolyayers ولكنها لاتنمو كما يجب وذلك نتيجة التثبيط التلامسى contact inhibition لأغشية الخلايا القريبة. تسمى هذه المزارع بأنها تظهر حالة confluence والتى تحد بشدة من كثافة الخلايا فى البيئة. هذه العقبة يمكن التغلب عليها بإستخدام support system مثل كرات صغيرة microbeads أو ألياف جوفاء hollow fibers.

فى حالة الأنسجة المفصولة زائدة التميز والتشكيل higlly differentiated excised tissue من الصعب زراعتها in vitro لأن خلايا يحدث لها عكس التشكيل والتمييز dedifferentiation فى الحال وأيضا لأنه من الصعب زراعتها فى البيئة الخالية من عوامل النمو أو من الهورمون الإستيرويدى أو ما يشابه ذلك steroid hormone supplement والموجود فى السيرم ومنها IGE، EGF، PDGF أو إستروجين oestrogen.

الزراعة المستمرة للخلايا والأنسجة continuous subculture يمكن حدوثه فى حالة الخلايا المحولة transformed cell lines أو التى تكون إما ناقصة monosomic أو زائدة trisomic كروموسوم أو أكثر طبيعيا naturally aneuploid أو متطفرة كيماويا chemically mutated وعلى سبيل المثال بواسطة 4- benzpyrene و ٣ أو nitrosomethylurea أو الخلايا المصابة بفيرس مثل Simian virus 40 (SV 40) أو Rous sarcoma virus. فى الخلايا المحولة وعلى سبيل المثال فإن خلايا كلية شبيه الفأر الصغير السن baby hamster hidney cells (BHK) تصبح منخفضة الإلتصاق التثبيطى reduced contact inhibition وقادرة على النمو فى المعلقات grow in suspension وتتغير فى شكلها وتفقد قدرتها على التشكيل neoplasia وتحتاج إلى بيئة محددة بدرجة أقل less stringently defined culture medium. بعض

الفيروسات المحولة transforming viruses يمكن أن تنقل جينات الأورام viral oncogenes والتى تكون مسئولة عن تكوين بروتينات والتى تحل محل عوامل النمو الموجودة طبيعيا فى السيرم.

الخلايا المحولة تكون مسئولة عن تكوين أورام عند حقنها فى عوائل مناسبة. التشابه الكبير بين الخلايا المحولة وخلايا الأورام تم إكتشافه وإستخدامه فى التجارب المعملية ولذلك تستخدم الخلايا المحولة بدلا من خلايا الأورام لأن الخلايا المحولة تكون اكثر تجاسا من الناحية السيتولوجية.

يتم تنمية الخلايا فى مزارع مستمرة continuous cultures أو مزارع غير مستمرة (مزارع تشغيل اى مزارع متقطعة أى مزارع قصيرة المدة) batch culture وفى كل الحالتين فإن التحكم فى تبادل الغازات وفى ضبط PH البيئة يكون هام ومحدد. لو أن الأوعية الزجاجية أو غيرها vessels مغلقة بإحكام sealed فإنه لابد من إضافة ثانى أوكسيد الكربون عند إضافة اللقاح بتركيز ٥% أو ١٠%. هذه الأوعية الزجاجية أو غيرها أو vented flasks يجب حفظها فى حضانات ك أ٢ CO2 incubators والتى تتحكم آليا فى ضبط درجة الحرارة وتركيز ثانى أوكسيد الكربون وفى وجود رطوبة مرتفعة. خواص نمو الخلايا تحدد تصميم الوعاء الذى يتم فيه زراعة الأنسجة. فى حالة مزارع الأنسجة الثابتة الصغيرة الحجم small- scale static culture of cells والتى تصل فيها حجم الخلايا إلى ١ سم مكعب فإنها يتم زراعتها فى حفر أو آبار فى أطباق تلائمها التركيزات المنخفضة microtitre plate wells أو يتم زراعتها فى أطباق مزارع أنسجة متخصصة خاصة specialized tissue cultures plates بها حفر او آبار ذات سعات وأحجام مختلفة والتى يتم تغليفها أولا pecoated بالجيلاتين. يمكن إستخدام أنابيب معينة scintillation vials. يمكن إستخدام أطباق بترى بلاستيك أو إستخدام زجاجات مسطحة الجوانب flat- sided bottles من الزجاج أو البلاستيك فى حالة المزارع الأكبر حجما حتى حجم ٥٠ سم^{٣}. يمكن إستخدام

مجاميع من زجاجات أو أوعية قابلة للدوران roller bottles والتى تدور بسرعة 1 r.p.m او أقل بواسطة آلة متخصصة (جهاز) تعطى مساحة سطح أكبر وحتى ١ ديسمتر مكعب من بيئة النمو. يمكن إزالة الخلايا بواسطة المعاملة بالتربسين. فى حالة المزارع المتخصصة وغالية الثمن يتم إستخدام اعمدة من كرات زجاجية glass bead columns أو ألياف جوفاء لتدعيم الخلايا فى البيئة to support cells والتى تكون سابقا تم إمدادها بغاز ثانى أوكسيد الكربون بتركيز ٥%.

مزارع المعلقات للخلايا suspension مثل lymphocytes أو hybridomas يمكن عملها بنجاح خاصة فى مخمرات ذات النطاق المحدود (صغيرة الحجم) small- scale fermenters وتكون طاقتها ١٠ ديسمتر مكعب وحيث يتم فيها هز الخلايا برقة مغناطيسيا. يمكن بديل عن الطريقة السابقة إستخدام small- scale airlift fermentors. إستخدام مزارع الأنسجة من نوع المعلقات للخلايا الحرة free cell suspension culture يكون محدود جدا ويفوقه الآن إستخدام نوع آخر من مزارع الأنسجة وهو نتيجة للتقدم فى الحاملات الدقيقة microcarriers والتى تسمح بعمل مزارع المعلقات ذات النطاق الواسع اى الإمكانية الكبيرة large- scale suspension culture والتى تكون من نوع الخلايا المعتمدة التثبيت anchorage- dependent cells. تتكون الحاملات الرقيقة من بوليمرات متداخلة مرتبطة ببعضها صليبيا أو شبه صليبيا cross linked مثل الديكستران، polyacrlamide، polystyrene أو البلاستيك والتى تحتوى عادة على شحنات موجبة أو سالبة والتى تسهل الإرتباط أو الإلتصاق. توجد أسماء تجارية للحاملات الدقيقة الموجبة الشحنة مثل Cytodex و Superbeads وحاملات دقيقة سالبة الشحنة مثل Rapid CellG، Biosolon. توجد كرات مغلفة بالجيلاتين غير مشحونة gelatin- coated beads تباع تجاريا ومنها Gele- beads توجد مشكلة رئيسية فى عزل الخلايا الحرة وتجمعات الخلايا من أعضاء وهى تحرير الخلايا أى فصل الخلايا من الأساس الحمل supporting matrix

دون أى تأثير أو ضرر لغشاء الخلية. وكانت المحاولات المبكرة فى هذا الصدد هى إستخدام طرق ميكانيكية مثل دفع النسيج خلال شاش أو حرير أو هز النسيج بواسطة كرات زجاجية فى محلول منظم مناسب. هذه الطرق تسبب ضرر ملحوظ للخلايا وينتج عنها محصول قليل من الخلايا. ويتضح هنا سؤال هام هذه الخلايا المعزولة بهذه الطريقة تكون مماثلة تماما للخلايا الموجودة أساسا فى النسيج؟ بإستخدام الطرق الكيموحيوية بدلا من الميكانيكية أمكن التغلب على المشاكل والصعوبات السابقة. فى حالة عزل خلايا الكبد فإن إستخدام collagenase و hyaluronidase فى بيئة خالية من الكالسيوم لهضم الأساس أى matrix وبذلك أمكن عزل خلايا ٩٥% منها محتفظة بحيويتها تماما والتى أمكن عزلها روتينيا on a routine bases. يفصل الكبد ويتم تقطيعه إلى شرائح ثم يحضن فى الإنزيمات المناسبة. وفى طريقة أخرى يعامل الكبد السليم in situ بحقنة او رشة وتشبعه بواسطة بيئة مدعمة بالأوكسجين خالية من الكالسيوم تحتوى إنزيمات ثم بعد ذلك يتم إزالتها وتجزيئتها بواسطة ملوق مستقيم غير مستدق blunt spatula. الطريقة الأخيرة تحتاج غلى خبرة عملية كبيرة ولكنها تعطى نتائج أفضل من حيث عدد الخلايا الناتجة وحيويتها. يمكن الكشف عن حيوية الخلايا فى جميع الحالات بواسطة قدرتها على التخلص أو إستبعاد أو عدم قبول صبغة أزرق التريبان trypan blue ولكن توجد طرق أخرى أفضل مبنية على التنفس وعلى تخليق البروتين.

زراعة خلايا الحيوان والإنسان لها تطبيقات كثيرة كنموذج modle لأنظمة كثيرة للدراسات الكيموحيوية والفسيولوجية والصيدلانيه وأيضا لإنتاج منظمات النمو وعوامل الدم blood factors والأجسام المضادة من النوع monoclonal والإنترفيرونات interferons والإنزيمات والفاكسينات vaccines والهورمونات وفيما يلى جدول عن إستخدامات مزارع الأنسجة لخلايا الحيوان والإنسان.

جدول ٢: التطبيقات المفيدة لمزارع الأنسجة فى الحيوان

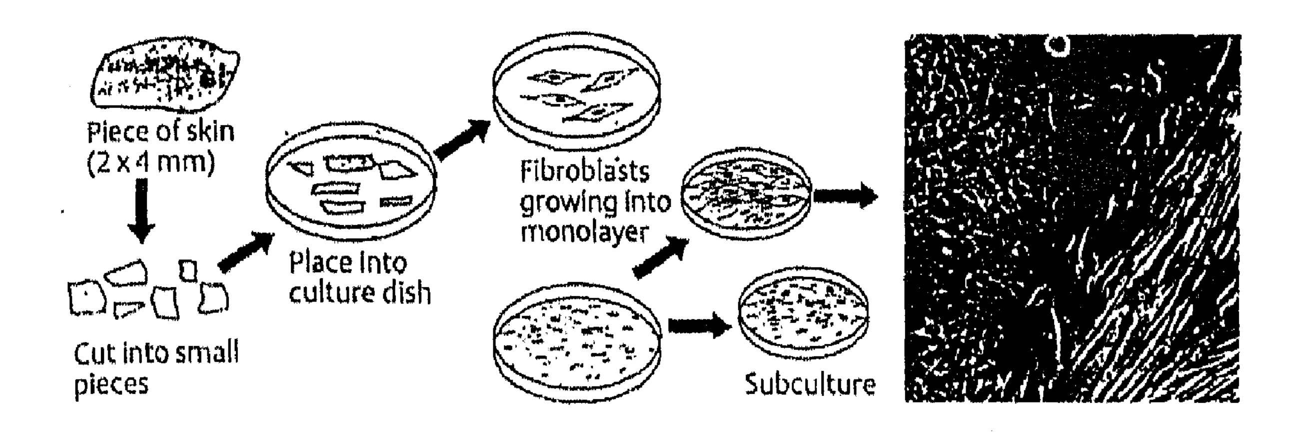
Baby hamster (BHK) cells	Large- scale production of foot and mouth vaccines
WI 38 (*ex* human embryo lung tissue)	Production of rubella vaccine
Simian Kidney epithelial cells	Production of polio vaccine
Murine lymphoblastoid cells	Production of histocompatibility (H-2^k) and differentiation specific (Thy-1) antigens
Myeloma cell lines	Production of monoclonal antibodies
T helper cells	Production of lymphokines
Leukocytes	Production of α- interferon
Diploid fibroblasts	Production of β- interferon
B or T lymphocytes	γ- interferon
Porcine kidney cells	Production of urokinase

فيما يلى تركيب بيئة لزراعة خلايا أورام للإنسان **human tumor cells** فى مزارع أنسجة **dispersed cultures** وهى خلايا تسمى **HeLA (HeLA cells)** يلاحظ أن نوعين من البروتين موجودة فى البيئة وهى ليست مغذيات ولكنها تستخدم فقط من الناحية الفيزيائية حيث أنها لازمة لنمو الخلايا خارج الجسم **not nutrients but satisfy certain physical requirements**. وتركيب البيئة كما يلى:

***HeLa Cells*:** **1. Glucose**

2. **Amino acids (arginine, histidine, lysine, tryptophan, phenylalanine, methionine, threonine, leucine, isoleucine, valine, glutamic acid, aspartic acid, praline, glycine, glutamine, tyrosine, cystine)**
3. **Vitamins (thiamine, riboflavin, pyridoxine, folic acid, biotin, choline, pantothenic acid, nicotinamide, inositol, hypoxanthine, vitamin B-12)**
4. **Inorganic salts**
5. **Proteins (fetuin and serum albumin)***
6. **water**

أما عن مزارع فيبروبلاست الجلد **skin fibroblast culture** فيمكن عملها كالآتى: (شكل ٩) جزء أو قطعة صغيرة من الجلد ٢x٤ مم يتم تحضيرها أى فصلها تحت ظروف معقمة ثم يتم تقطيعها إلى أجزاء صغيرة ثم توضع على بيئة فى طبق بترى.



شكل ٩: خطوات عمل مزارع فيبروبلاست الجلد Skin fibroblast culture.

هذه الأجزاء لابد ان تلتصق أو تلامس قاعدة الطبق. بعد ٤–١٨ يوم تبدأ الخلايا فى النمو وتتسع مساحة وحجم هذه الأجزاء نتيجة لإنقسام الخلايا. هذه الخلايا لا تنمو ولا تنقسم إلا عند إتصالها أو ملامستها لقاع الطبق ويعرف ذلك بإسم مزارع الإلتصاق أو مزارع اللزق adhesion culture وذلك أيضا لوجود حالة تثبيت للخلايا anchorage dependency of cells. عندما تغطى تماما قاعدة الطبق أو حاوية المزرعة أو القارورة الحاوية culture vessel بطبقة كثيفة الخلايا فغنها تتوقف عن النمو نتيجة للتثبيط التلامسى contact inhibition ولكن هذه الحالة غير موجودة اى غائبة فى حالة خلايا ومزارع الأورام. ولذلك يتم تجديد النمو على طبق آخر subculturing وهكذا تستعيد الخلايا نموها وإنقسامها وهكذا يمكن أن يتكرر لمرات عديدة فى سلسلة من التتابعات وهكذا نحصل على ملايين عديدة من الخلايا.

مـــزارع الأنسجة فى النبات
Plant Tissue Culture

مزارع الأنسجة فى النبات هى عبارة عن زراعة أى عضو أو جزء او نسيج او مجموعة خلايا او خلية واحدة او بروتوبلايت اى خلية عارية على بيئات صناعية فى ظروف بيئية معقمة.

البيئات تعقم بالأوتوكلاف وأحيانا بالترشيح لبعض مكونات البيئة التى تتأثر بالحرارة مثل بعض الفيتامينات. بعض أمثلة للبيئات المشهورة فى هذا الصدد هى Shenck and ،Murashige aud Skoog ،Gamborg B5 ،Nitsch ،Murashige ،Hildebrandt .Mc Coen's Woody Plant Medium (WPM). بالإضافة إلى مخلوط المتزن من العناصر الصغرى والعناصر الكبرى والتى تكون بيئة ذات جهد أسموزى مناسب فإنه يضاف إلى البيئة بعض المركبات ذات النشاط الأسموزى على هيئة مصدر للكربون بتركيز ١% إلى ٥% وزن حجم لأن الأنسجة فى مزارع الأنسجة لا تكون ذات كفاءة بناء ضوئى عالية بدرجة مائة فى المائة بل أقل من ذلك وقد يكون أقل من ذلك بكثير بالرغم من وجود جميع الصبغات اللازمة للبناء الضوئى. يضاف للبيئة نيتروجين فى صورة غير عضوية مثل النترات والأمونيا وفى صورة عضوية مثل اليوريا والجلوتامين والكازين المحلل casein hydrolysate. إضافة الفيتامينات اللازمة لمرافقات الإنزيمات تكون فى صورة فيتامينات مجموعة B. أغلب مزارع الأنسجة الغير ناتجة من أورام تحتاج منظمات نمو مثل إندول حامض الخليك ونفثالين الخليك ونفثالين حامض الخليك، D -4 و 2. تضاف السيتوكينينات فى صورة زيتين أو كينتين وقليلا ما تستخدم الجبريللينات. تكوين النمو وإستمراريته يتوقف على درجة الإتزان بين مكونات البيئة من منظمات النمو وتركيزاتها المطلقة. أغلب البيئات المستخدمة محددة كيماويا ولكن أحيانا يضاف لبن جوز الهند أو مستخلص الخميرة. المحاليل المنظمة عادة لا تضاف للبيئة. قد تحتوى البيئة فحم حيوانى بتركيز يصل حتى ٣% وزن حجم أو (PVP) polyvinylpyrrolidone وأيضا قد تحتوى على مضادات الأكسدة مثل السترات وحامض الأسكوربيك والثويوريا أو dithiothreitol (DTT) لتمنع حدوث الون البنى والتى تنشأ عن تحرر الفينولات والأكسدة والبلمرة. يضاف أحيانا بعض المركبات تسمى منشطات السطح surfactants الغير أيونية مثل -poloxyethylene polypropylene copolymer pluronic F68 لتزيد من نفاذية الغشاء البلازمى.

المركبات المشبعة بالأوكسجين مثل perfluorochemicals (PFCs) ومنها (Flutec PP5) perfluorodecalin تنشط النمو لأنها تحسن من إمداد الخلايا بالأوكسجين. تستخدم مرشحات من نترات السليلوز أو من النيلون ذو الثقوب الدقيقة microporous nylon meshes وهى بذلك تزيد من كفاءة التهوية للخلايا وتزيد من كفاءة النمو. بعض المركبات المعوقة للنمو قد تاف للبيئة مثل paclobutrazol لتحسن من الحالات التشريحية والفسيولوجية الغير طبيعية والمرتبطة بتحضين الأنسجة لفترات طويلة فى رطوبة نسبية مرتفعة. وهذه التغيرات تقل عند إستخدام بيئة شبه صلبة لوجود الآجار بتركيز ١% وزن حجم. يعتبر الآجار غروى طبيعى ويكون مختلف التركيب والجودة. نوع الآجار قد يكون له دور تأثير جوهرى على سهولة حدوث تشكيل أعضاء النبات organogenesis. ونظرا لأن الآجار مرتفع الثمن فإنه يستخدم بدلا منه أحيانا عوامل اى مركبات تركيبية مصلبة synthetic gelling agents مثل gerlite. وفى حالة البيئات السائلة قد تحتاج دعامات مثل قضبان زجاجية أو مقويات أو مدعمات أو ساندات ورقية paper rafts أو مرشحات نيلون nylon mesh filters.

تبدأ مزارع الأنسجة بفصل الجزء المرتد زراعته ويتم تعقيمه سطحيا. تستخدم عادة الأوراق لمزارع البروتوبلات والمتك لإنتاج النباتات الأحادية والقمة النامية لزراعة الساق والقمة النامية للجذر لزراعة الجذر. يتم التعقيم قبل الزراعة بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم والذى ينتج عنه غاز الكلور والذى يعمل كقاتل biocide وتكون مدة التعقيم حوالى ٥ دقائق يتم إزالة محلول هيبوكلوريت الصوديوم والغسيل بماء معقم مقطر.

الأجزاء المقطوعة من النبات explants تستجيب لزراعة الأنسجة عندما يكون النسيج نشط فسيولوجيا. يتكون مباشرة بعد القطع خلايا نسيج الكالس الغير متشكلة والتى تتكون من خلايا بها قليل من السيتوبلازم وفجوات عصارية كبيرة. هذا النسيج

يكون اجزاء محدودة localized كمراكز للنمو تسمى اشباه المرستيمات meristemoids أو يمكن تسمى بالمرستيمات ومنها تنشأ الجذور والسيقان أو كلاهما. قدرة الكالس على تكوين جذور أو سيقان النبات تتحكم فيها الوراثة تماما ولكن يمكن التأثير عليها وتشجيعها فى مزارع الأنسجة بإستخدام نسب متناسبة من السيتوكينين والأوكسجين تساعد تكوين السيقان والعكس صحيح فى حالة الجذور. عمليا يمكن إنتاج النباتات الصغيرة معمليا من الكالس وذلك بتشجيع تكوين السيقان على بيئة غنية بالسيتوكينينات ثم ينقل إلى بيئة غنية بالأوكسينات لتشجيع تكوين الجذور وتفسير ذلك غير معروف حتى الآن. لا يفضل تكوين الأعضاء من نسيج الكالس لأن به إختلال فى عدد الكروموسومات وقد يكون الإختلال فى الكروموسوم وينتج عن ذلك نباتات غير طبيعية aberrant plants. ولتلافى ذلك تستخدم مزارع القمة النامية للساق ولذلك تكون النباتات الناتجة أكثر ثباتا. مزارع الأنسجة المرستيمية مفضلة فى ذلك الصددز المزارع المرستيمية تستخدم أحيانا فى شفاء النباتات من الفيرس بعد المعاملة بدرجة الحرارة المرتفعة أو الكيماويات.

يستخدم الكالس فى عمل مزارع المعلقات suspension culture وحيث يوجد فيها خليط من خلايا منفردة وخلايا متجمعة فى بيئات سائلة ومع وجود تهوية جيدة لمنع حدوث ضرر الغمر للخلايا waterlogging. حدوث وسهولة عمل مزارع المعلقات تخضع للتركيب الوراثى للكالس. ولكن عمل تسهيل غنفصال الخلايا من الكالس وجعله هش أو سهل الكسر friability وذلك فى بعض الحالات بخفض تركيز الكالسيوم فى البيئة وأيضا بتغير تركيزات منظمات النمو أو بإضافة مضادات الأكسدة أو تغيير تركيز وخلط الهواء والغازات أو بالتوفيق بين جميع هذه العوامل.

مزارع معلقات الخلايا : Plant cell Suspension

يتم عملها على نطاق صغير أو متوسط أو كبير medium or large scale و small. يمكن إستخدام الخلايا المفردة ويتم تنميتها وتحضينها فى حجرات الشرائح

الميكروسكوبية microscope slide chamber. يمكن إستخدام الدوارق ذات العنق الواسع wide- necked Erlenmeyer flask ويتم هزها على هزاز وأحد أنواع هذه الهزازات horizontal platform orbital shakers. وهذه الدوارق تصلح للزراعة على نطاق صغير. يمكن إستخدام أوعية كبيرة تسمى fermentors كفاءة حجمها تصل إلى خمسون ألف ديسمتر مكعب ويتم إمدادها بالهواء. معلقات الخلايا تكون مناسبة وجيدة لدراسة إنقسام الخلايا وإستطالتها وتشكلها وخطوات التحول الغذائى الوسيطة وذلك لسهولة إضافة المركبات اللازمة للإختبارات وسهولة جمع الخلايا والبيئة لعمل الدراسات اللازمة والتحليل. يعتبر إستخدام الكائنات الحية الدقيقة أكثر كفاءة فى كثير من الدراسات عن مزارع معلقات الخلايا لأن خلية النبات أكبر حجما (أكبر من ٥١٠ ميكرومتر٣) وتحتوى أكثر من ٩٠% ماء حجم وسرعة التكاثر أى التضاعف الخلايا منخفضة عادة ١-٢ يوم وعادة لا تفرز نواتج التحول الغذائى فى البيئة بل يتم تجميعها فى الفجوة العصارية. بالإضافة إلى ذلك تعتبر مزارع الأنسجة أكثر تكلفة وتحتاج إلى فترة زراعة طويلة نسبيا عادة أسابيع ومع وجود عدم إتزان لحدوث التضاعف فى حالة فترات الزراعة الطويلة، وهذه الأسباب تحد من إستعمالهم كمصدر لإنتاج العقاقير بطريقة اقتصادية والعطور ومحسنات الطعم واللون والرائحة food additives والمبيدات biocides الخ. بالرغم من ذلك تستخدم مزارع معلقات الخلايا أحيانا لإنتاج النواتج الثانوية لأن هذه المركبات لا يمكن إنتاجها بالطرق الكيماوية أو أنها غير اقتصادية. مزارع معلقات الخلايا تكون مفيدة فى حالة وجود طفرات وذلك بتنمية المستعمرات فى وجود مركبات إنتخابية، ويمكن أن يكون ذلك عن طريق خلايا مفردة أحادية. يمكن الحصول على معلقات الخلايا المفردة وذلك بتمريرها على سلسلة من مرشحات ذات سعة ثقوب مختلفة حتى تصل سعة الثقوب ٥٠ ميكرومتر مربع. الخلايا المفردة التى تستخدم لإعطاء محصول عال من الخلايا عادة تنقل إلى بيئة الإنتاج Production medium والتى يوجد فيها إمكانية وجود

ضغط خفيف والتى ينتج عنها كبح لإنقسام الخلايا إلى حد ما مع حدوث تشجيع لدرجة ما على تشكيل الخلايا.

يمكن إنتاج تركيز مرتفع من نواتج التحول الغذائى الثانوية secondary metabolites فى حالة مزارع الخلايا فى وجود حبيبات من ألجينات الكالسيوم calcium alginate أو مجموعة من مواد مدعمة خاملة inert support ولو أن هذه الطريقة لها إستخدام محدود فى الأغراض الصناعية. أيضا يمكن أن تستخدم الخلايا الحرة أو الثابتة immobilized cells فى تحويل المركبات الأصل precursor الرخيصة إلى مركبات ناتجة غالية الثمن وهذا مايسمى بالتحويل الحيوى biotransformation ولكن أيضا هذه الطريقة محدودة فى إستخدامها على نطاق واسع.

فى حالة إستخدام مزارع الخلايا المفردة لإنتاج النبات الكامل فإنه يجب نقل الصفات المطلوبة عن طريق البذور. بعض النباتات مثل الجزر ونخيل الزيت تكون أجنة جسدية somatic embryos أى أشباه أجنة embrioids أى أجنة عرضية adventive embryos فى المعلق بكميات كبيرة نسبيا موضحة بذلك حالة totipotency. ومن هذه الأجنة العرضية أو الجسدية الأخيرة يمكن إنتاج النبات الكامل كما أنه منها يمكن إنتاج البذور صناعيا بتغليفها للوقاية بواسطة راتنج مناسب واق. فى حالة النبات الكامل تنقسم الخلية لتكون كتلة من الخلايا كروية ثم قلبية الشكل ثم طوربيدية الشكل ثم يتكون شبه الجنين الكامل من فلقتين وريشة وجذير وهذا ينمو ليعطى نبات صغير.

يمكن عمل مزارع معلقات الخلايا المفردة بواسطة إستخدام إنزيم بكتنيز ووضعه مع الأوراق أو أى جزء منها أو أى جزء نباتى مناسب. هذا الإنزيم موجود تحت أسماء تجارية كثيرة مثل Macerozyme R10، Pectolyase Y23، Rhozyme HP 150 وتستخدم على هيئة محاليل بتركيزات تتراوح بين ٠,٠٣% إلى ٠,٢% وزن

حجم. وفى حالة مزارع البروتوبلاست يستخدم هذا الإنزيم مع إنزيمات السيليوليزات. توجد الأخيرة وتباع تحت أسماء تجارية Cellulase، Cellulysin، Driselase وتستخدم على هيئة محاليل بتركيزات تتراوح بين ١ إلى ٢% وزن حجم.

فى حالة مزارع البروتوبلات يجب إستخدام محاليل منظمة وأن تكون محددة الجهد المائى أى الضغط الأسموزى لتفادى إتفجار البروتوبلاست ويستخدم لذلك المانيتول أو السربتول حتى تركيز يصل ١٥% وزن حجم عادة وتبعا للحالة. يتم عمل ذلك بأخذ شرائح رفيعة من الورقة ووضعها فى طبق بترى وعليها محلول الإنزيمات السابقة وبيئة التحضين المناسبة وتوضع فى الظلام على درجة ٢٥ مئوية وتكون ثابتة لا تهز وذلك طوال الليل. يتم تنقية البروتوبلاست من بيئة التحضين بعمل ترشيح لإزالة البقايا ثم عمل طرد مركزى بسرعة بطيئة low speed density gradient centrifugation. البروتوبلاست الذى يوجد على السطح الفاصل يتم إزالة بسحبه بواسطة ماصات باستير. أحيانا يضاف للبيئة مضادات حيوية مناسبة ليصبح البروتوبلاست غير ملوث. يمكن تحضين البروتوبلاست بنجاح بطرق عديدة ولكن قبل التحضين يجب غسيل البروتوبلاست وعدها لتحديد الكثافة الفعالة للقاح effective inoculation density لحدوث النمو. عد الخلايا أو البروتوبلاست يتم عمله بإستخدام الهيموسيتومتر أو بعداد خاص مثل Coulter counter. تقدير حيوية البروتوبلاست يكون بإستخدام FDA أى flowrescein diacetate أو بإستخدام مجهر الأشعة فوق البنفسيجية أو بإستخدام صبغة إيفانز الزرقاء Evans Blue Stin وبإستخدام المجهر الضوئى. تعمل صبغة FDA تبعا للقاعدة أن الصبغة غير متفلورة ولكن أثناء غختراقها لأغشية البروتوبلاست فإنها تتحول إلى صبغة متفلورة نتيجة لنشاط إنزيمات الأستيريزات endogenous estrases. والعكس صحيح فى حالة صبغة إيفانز حيث أنها تستبعد بواسطة الأغشية الحية. يتم زراعة البروتوبلاست على بيئة الآجار أو آجاروز ٤,٥% وزن حجم أو فى نقطة معلقة على غطاء أو قاعدة طبق بترى. كثافة اللقاح تكون عادة حوالى $١٠^{٤}$ بروتوبلاست لكل سم^{٣}. مزارع البروتوبلاست

ثابتة ودرجة الحرارة تتراوح بين ٢٥- ٣٠ مئوية مع وجود إضاءة ضعيفة مستمرة. لا يبدأ البروتوبلاست فى الإقسام حتى تكوين جدر الخلايا أى بعد تكوين جدر الخلايا ويحدث ذلك فى حوالى ٢٤ ساعة وتبعا للنبات والعضو. يحدث نمو المستعمرات بعد حوالى أسبوعين ولزيادة سرعة النمو فإن المستعمرات تنقل لبيئة حديثة **fresh medium** ولها ضغط أسموزى منخفضة. فى حالة الإحتياج للنباتات الصغيرة **plantlets** فإنها تستخدم بيئة إعادة التكوين **regeneration medium** وبها تركيزات متوازنة من منظمات النمو. يستخدم البوتوبلاست بكثرة فى علوم النبات. ومنها علم الفيروسات حيث تحدث إصابة للبروتوبلاست بالفيرس وإلتقام العضيات وإعادة تكوين الجدار الخلوى. يستخدم أيضا بكثرة فى حالة نقل الصفات الوراثية والتهجين الجسدى **genetic transformation and somatic hybridization**. تزاوج البروتوبلاست هام فى تجارب تربية النبات لتخطى عقبة عدم التوافق الجنسى بين الأجناس أو الأنواع والتى تمنع تكوين زيجوتات طبيعية.

طرق تهجين البروتوبلاست الناجحة تعتمد على إستخدام طرق ناجحة لتزاوج البروتوبلاست وإنتخاب الهجن المتزاوجة لإنتاج نباتات صغيرة وأيضا دراسة هذه النبتات الناتجة. الطرق المستخدمة فى التزاوج إما كيماوية أو طبيعية مثل **electrofusion**. الطرق الكيماوية تعتمد على إستخدام محاليل حاضنة تحتوى على تركيزات مرتفعة من **PEG** أى بولى إيثلين جليكول ٣٠% وزن حجم ومع وجود **PH** مرتفع ومحاليل كالسيوم (ذات **PH** ١٠,٤، ١,١% وزن حجم كلوريد كالسيوم مع وجود مانيتول بتركيز ١٠% وزن حجم). يحدث الإلتحام عادة فى أقل من نصف ساعة. طريقة **PEG** مفضلة عندما يحدث التزاوج بين بروتوبلاست النسيج الوسطى فى الأوراق لأنها تميل إلى الإنفجار فى **PH** مرتفع. بيئة التزاوج **fusion medium** يجب إزالتها قبل إستخدام بيئة التحضين.

طريقة التزاوج الكهربائى **electrofusion** تحدث فى خطوتين فى الأولى بوضع

البروتوبلاست فى بيئة لها توصيل كهربائى منخفضة بين إلكترودين (سلوك بلاتين مرتبة بالتوازى على شريحة زجاجية. يتم عمل مجال وحقل كهربائى بين الإلكترودين ذو تردد مرتفع a high frequency alternsting field (0.5 to 1.5 MHZ) يسبب ذلك أن يصطف البروتوبلاست وتعرف هذه الطريقة بإسم di- electrophoresis. فى الخطوة الثانية فإن نبض كهربائية واحدة قصيرة أو أكثر (10- 20µ s) ويكون النبض الكهربائى المباشر ١- ٣ كيلو فولت لكل سم وحيث يسبب ذلك تكوين ثقوب فى أغشية البروتوبلاست وبذلك يحدث الإلتحام بين الأغشية القريبة من بعضها. هذه الطريقة لها درجة كبيرة من التحكم فى التزاوج بالمقارنة بالطريقة الكيماوية.

استخدام البروتوبلاست فى تجارب التحول الوراثى gentee transformation لسهولة إصابته بالبكتريا A. Tumefaciens. فى هذه الحالة يستخدم بروتوبلاست معقم ويعلق فى درجة حرارة ٢٥ مئوية فى تحضير به بلازميد فى محلول معلق يوجد أيضا poly- L- ornithine بتركيز ١٠ ميكروجرام لكل سم٣. وبعد فترة التحضين والتى تكون تحت تفريغ فإن البروتوبلاست المغسول يتم زراعته بتركيز لقاح مناسب على بيئة غنتخابية مناسبة. تأخذ البيئة الإنتخابية أشكال عديدة ولكن أكثرها غستعمالا مبنية على إدخال جين مرتبط مقاوم أى معلم marker فى ناقل وسيط مناسب للتوطين (الكولنة) coling vector ومثال ذلك الجين kanamycin أو hygeromycin. إستخدام البكتريا A. tunefaciens يكون محدود أساسا للأصناف التى تصاب طبيعيا بالبكتريا السالبة لصبغة جرام أنه حتى الآن لا تداخل نباتات الحبوب فى هذا المضمار. إكتشفت حديثا سلالات من هذه البكتريا هائلة القدرة على الإصابة supervirulent والتى يمكنها عمل التحول الوراثى فى مزارع الأنسجة لنباتات ذوات الفلقة.

يمكن تحويل البروتوبلاست transformed بواسطة الحقن مباشرة بدنا او بالتثقيب الكهربائى electroporation أو بالغزو بالليبوسوم liposome invasion أو

بالقذف بالجزيئات الدقيقة particle bombardment (biolistics) أو بإستخدام ألياف من كاربيد السيلكون silicon carbide والتى تسبب تثقيب الغشاء. فى حالة التثقيب الكهربائى يتم تحضين البروتوبلاست فى أنابيب صغيرة من الكوارتز عادة cuvettes ومصممة خصيصا لذلك. يستخدم تيار مباشر مدته قصيرة ليسبب حدوث ثقوب فى الغشاء وبذلك يسمح لدنا إختراق الغشاء بسهولة إستخدام المقذوفات microprojectiles ويسمى biolistics مفضل الآن عن جميع الطرق السابقة لأنها تجرى على الأجزاء المفصولة explants بسهولة عن جميع الطرق السابقة. توجد أمثلة عديدة لإدخال ناجح لدنا لعائل جديد ومنها تبعا لذلك مقاومة التجميد أى درجة التجمد فى الشتاء القارص البرودة أو مقاومة الفيرس أو مقاومة الفطريات. يمكن أيضا إستخدام مزارع الأنسجة بإستخدام الأدران فى نقل الجينات المقاومة لمركبات glyphosates بإستخدام بكتريا التدرن التاجى وذلك فى حالة نبات اللفت أو السلجم *Brassica napus*. يمكن أيضا إستخدام بكتريا التدرن التاجى فى نقل جينات تسمى antisense genes لتثبيط نضج ثمار الطماطم. يمكن عمل نقل للجينات بزراعة البروتوبلاست مع بكتريا التدرن التاجى وذلك فى حالة نبات البطاطس.

مزارع الكائنات الحية الدقيقة
Microorganisms Cultures

أعتبر اللفظ كائنات حية دقيقة شامل البكتريا ولفطريات والخميرة والطحالب وحيدة الخلية والطحالب الخيطية والحيوانات الأولية وقد تشمل بعض الديدان مثل النيماتودا. زراعة الكائنات الحية الدقيقة على بيئات تكون مفيدة لأنها أبسط فى تركيبها من الإنسان والحيوان ولذلك تكون الدراسات العلمية والبحثية عليها أسهل. حيث أن كثير من نظم وتفاعلات الحياة تم معرفتها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا إ. كولاى، Bacillus subtilis ومن الخميرة، خميرة الخباز *Saccharomyces cerevisiae* وأيضا الخمائر الغير حقيقية مثل Candida albicans

وأيضا الطحالب وخاصة الخضراء مثل الكلوريللا *Chlorella vulgaris*، وفى بعض الدراسات الوراثية إستعمل الطحلب الأخضر *Chlamydomonas dysosmos* أستيابيولاريا *Acetabularia*. ولبساطة تركيب البكتريا على وجه الخصوص فقد إستخدمت فى التعرف على آلية حدوث تضاعف دنا أى تكاثره أى زيادة فى العدد، علاقة عمليات النسخ والترجمة بواسطة رنا لمعرفة تعبير الجين عن نفسه خاصة وإنها أحادية فتسهل إستخدام الطفرات. يمكن دراسة الطفرات عليها بسهولة كبيرة وقد تم بالفعل ذلك. الدراسات الوراثية على البكتريا والخميرة (الخميرة من الفطريات) أدت إلى نشوء وتقدم الهندسة الوراثية وأساسها توطين الجين gene cloing.

تركيب البيئة لتنمية هذه الكائنات الحية الدقيقة يختلف بإختلاف الكائن الحى ونوع تغذيته حيث توجد أنواع عديدة التغذية chemolithotroph و chemoorgano troph و photolithroph و photoorganotroph، وهل السلالة عادية أى برية wild type أو طفرة يتوقف عليها التغذية وتركيب البيئة. تكون البيئات سائلة وأحيانا يفضل إضافة مركبات تصلب البيئة gelling agent مثل الآجار ليساعد على سهولة النمو السطحى للكائنات الحية الدقيقة. فى حالة البيئات فى الأغراض الصناعية لإنتاج منتج معين تكون معقدة التركيب أو ذات تركيب خاص معين.

عامة التغذية فى الكائنات الحية الدقيقة تختلف كثيرا وبالتالى البيئة أو الوسط. ففى الطحالب لأنها ذاتية التغذية فإنه يمكن تنميتها على بيئة بسيطة التركيب حيث أنها قادرة على تخليق المركبات العضوية كالجلوكوز والسكروز وهكذا تنمى الطحالب فى محاليل سائلة وبها العناصر الضرورية اللازمة وقد يقابل ذلك صعوبات ولكن يمكن للباحث التغلب عليها يلاحظ أيضا درجة الملوحة فى البيئة فى حالة طحالب المياه العذبة والطحالب البحرية. ولكن الأكثر تعقيدا فى التغذية الفطريات والبكتريا والحيونات الأولية حيث أنها معتمدة التغذية تماما أى غير ذاتية التغذية، إلا بعض أجناس البكتريا الذاتية التغذية ضوئيا أو كيماويا، ولذلك تكون البيئة أكثر تعقيدا فى

التركيب من بيئة الطحالب حيث يضاف إليها مركب عضوى مصدر للكربون مثل الجلوكوز أو السكروز وغيرها حيث قد يضاف الببتون كما فى بيئات كثير من البكتريا. عامة من أوائل العلماء الذين فكروا فى زراعة البكتريا والكائنات الحية الدقيقة على بيئات وعلى أسس علمية سليمة هو العالم الألمانى الطبيب روبرت كوخ فى أواخر القرن الثامن عشر ١٨٤٣- ١٩١٠ وأيضا طبق بترى المشهور للعالم بترى Petri والذى لازال يستخدم حتى الآن فى جميع أنواع المزارع للكائنات الحية الدقيقة وللإنسان وللحيوان وللنبات. وهكذا كانت فكرة مزارع الأنسجة للنبات والحيوان والإنسان محاكاة لما يحدث فى الكائنات الحية الدقيقة منذ أواخر الثمانينيات. وقد كانت مزارع الأنسجة فى النبات أسرع إنجازا من الحيوان والإنسان، ولكن الآن فإن الأخيرة تطورت فى الآونة الأخيرة بسرعة وبإنجازات مرموقة. أما عن تركيب البيئات المختلفة المستخدمة فى مزارع الأنسجة للنبات أو الحيوان أو الإنسان أو الكائنات الحية الدقيقة فقد تم ذكر أمثلة منها فى أجزاء من هذا الكتاب.

أما فى حالة الفيروسات والفيروسات viroids فإنه لا يمكن تنميتها على بيئات صناعية ولكن يمكن تنميتها على أجزاء حية وفى حالة فيروسات النبات فإنها تنمى على نباتات حية وفى حالة فيروسات الحيوان والإنسان فإنها تنمى على أنسجة حية ويمكن أن يستخدم البيض فى ذلك. والفيرويدات تعامل نفس الشيئ. وفى حالة التحصين بالفاكسينات أو الأمصال وخلافه فى أمراض الإنسان فإن الفيروسات تنمى على الحيوانات لتوهينها مثل فيروس الجدرى فإنه يتم نقله على الأبقار الحية لعمل عملية التوهين وهكذا يتم تنمية الفيروسات على الكائنات الحية. حديثا فى بعض الحالات أمكن كسر هذه القاعدة إلى حد ما فى الفيروسات.

فى الفطريات بالرغم من أن جميعها يمكن تنميته على بيئة صناعية إلا أن جاميع قليلة من الفطريات تكون إجبارية التطفل ولا يمكن تنميتها على بيئات صناعية مثل فطريات البياض الزغبى وفطريات البياض الدقيقى وفطريات الصدأ الأبيض. وعامة

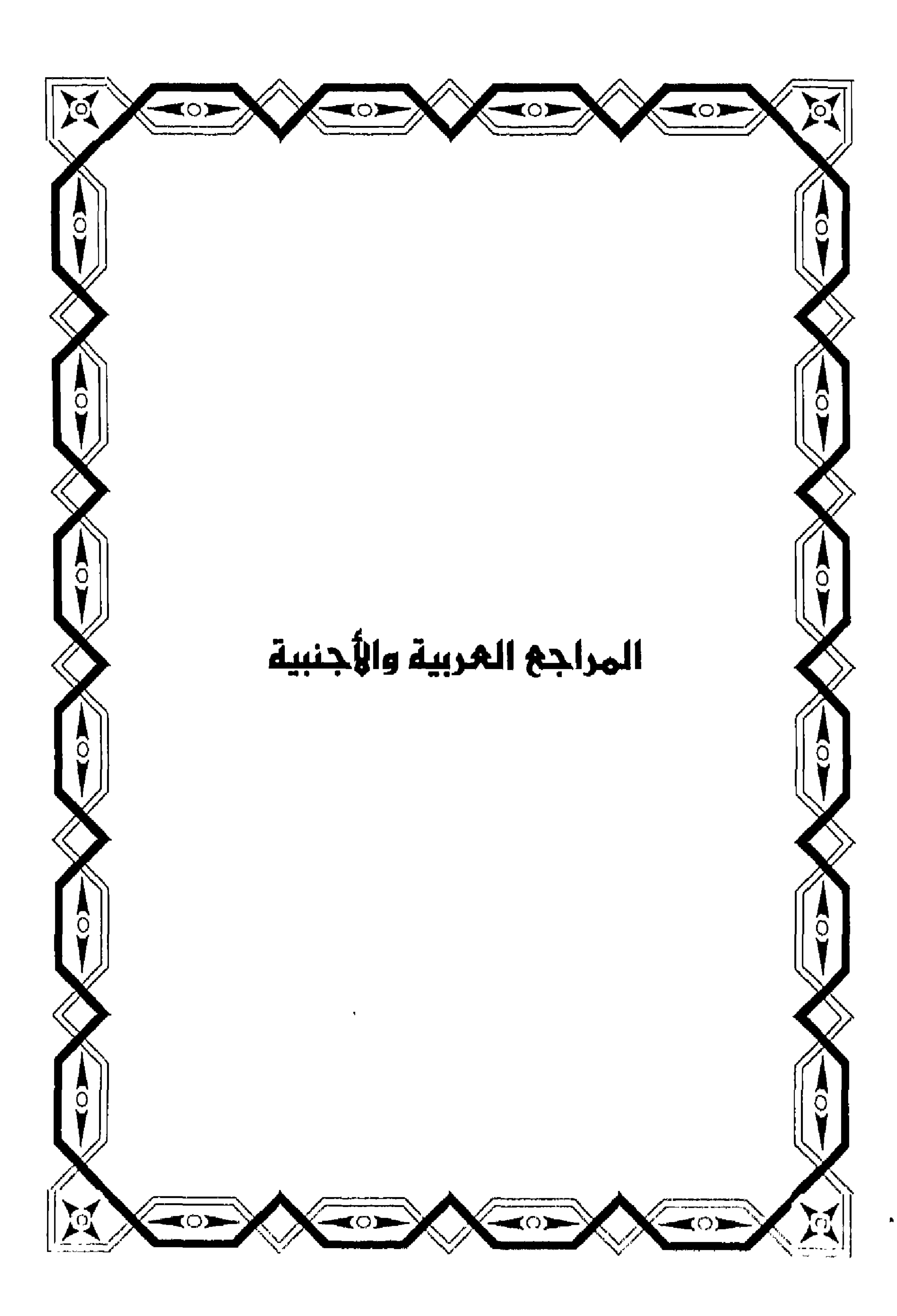
يمكن تصنيف الكائنات الحية كما يأتى:

١ - كائنات حية ذاتية التغذية autotroph مثل جميع النباتات وهى النباتات الزهرية والنباتات عاريات البذور والتيريديات والخرازيات والطحالب وبعض أجناس البكتريا.

٢ - كائنات حية معتمدة التغذية heterotroph مثل الإنسان والحيوان والفطريات والبكتريا. وهذه المفترس مثل بعض أنواع الحيوانات وتسمى الحالة بالإفتراس pre- dation ومنها الطفيلى ويعيش على كائن آخر أى طفيل parasite وعادة يسبب له مرض ويسمى pathogen مثل البكتريا والفطريات والحيوانات الأولية والديدان والفيروسات والفيرويدات والتى تسبب أمراض للإنسان أو الحيوان أو النبات. والنوع الثالث كائن رمى saprophyte وهو يعيش على المواد العضوية أو كائنات ميتة مثل البكتريا الرمية والفطريات الرمية (البكتريا بعضها رمى وبعضها طفيلى وبعضها ذاتى التغذية) (الفطريات بعضها طفيلى وبعضها رمى). فى البكتريا والفطريات قد يكون الكائن طفيلى ورمى فى آن واحد وفى هذه الحالة يسمى إختيارى التطفل obligate parasites أى أنها لابد أن تعيش على كائن آخر إنسان أو حيوان أو نبات.

فى جميع الحالات السابقة يمكن تنميتها على بيئات مثل خلايا النبات أو بعض خلايا الإنسان والحيوان وأيضا جميع الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا والفطريات عدا الفيروسات والفيريدات وبعض الفطريات وبعض الحيوانات الأولية وبعض الديدان.

عامة توجد بيئات كثيرة للفطريات منها بيئة آجار البطاطس والدكستروز PDA وبيئة محددة التركيب الكيماوى وهى بيئة تشابك Czapek وتوجد بيئات أكثر عدداً للبكتريا ومنها بيئة الآجار المغذى nutrient agar وغيرها كثير.



المراجع العربية والأجنبية

المراجـــع

أولاً – المراجع العربية :

١ – عماد، فسيولوجيا النبات، ١٩٩٨، المكتبة الأكاديمية، القاهرة. (منفردا).

٢ – منظمات النمو والإزهار، ١٩٩٥، المكتبة الأكاديمية، القاهرة. (منفردا).

٣ – أساسيات أمراض النبات والتقنية الحيوية، ١٩٩٣، المكتبة الأكاديمية، القاهرة. (منفرداً).

٤ – أبصال الزينة وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومة، ١٩٨٩، منشأة المعارف بالأسكندرية بالإشتراك مع الدكتور / محمود خطاب (طبعة ثانية ٢٠٠٢).

٥ – زهور القطف وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومة، ١٩٨٩، منشأة المعارف الأسكندرية بالإشتراك مع الدكتور / محمود خطاب.

٦ – مورفولوجيا وتشريح النبات، طبعات كثيرة من ١٩٦٩ حتى ١٩٩٠، دار المعارف الحديثة بالأشتراك مع الدكتور / حسين العروسى.

٧ – المملكة النباتية، طبعات كثيرة من ١٩٧٠ حتى الآن، دار المعارف الحديثة، بالأشتراك مع الدكتور / حسين العروسى.

٨ – الأطلس النباتى، ١٩٩٠، دار المعارف الحديثة بالأشتراك مع الدكتور / حسين العروسى والدكتور / سمير ميخائيل.

٩ – فسيولوجيا النبات التجارب العملية، ١٩٧٩، دار المطبوعات الجديدة بالأشتراك مع الدكتور / جمال حسونة والدكتور / مجدى مدكور.

١٠ – طرق ومناهج البحث العلمى، ٢٠٠٣، منشأة المعارف بالأسكندرية. (منفرداً).

ثانياً – المراجع الأجنبية :

Agriso, G. N. 1997. Plant Pathology. Academic Press, U.S.A.

Alcamo, E. D. 2001. Encounters In Microbiology. Jones and Bartlett Publishers. Boston, U.S.A.

Alcamo, E. D. 2001. Laboratory Fundamentals of Microbiology. Jones and Bartleet Publishers, U.S.A.

Anonymous. 2001. The Ribosome. Cold Spring Harbor Laboratory Press-A Symposium.

Banwart, G. J. 1989. Basic Food Microbiology. Chapman and Hall, Inc., New York, U.S.A.

Berne, R. M.; Levy, M. W. 1990. Principles of Physiology. The C. V. Mosby Company. St. Louis, U.S.A.

Bernstein, R.; Bernstein, S. 1996. Biology. WCB. WM. C. Brown Publishers, U.S.A.

Berzins, A. 1998. Basic Cloning Proceduers. Springer Verlag, Germany.

Bettelheim, F. A.; March, J. 1998. Introduction to Organic and Biochemistry. Harcourt Brace College Publishers, U.S.A.

Blackstock, J. C. Biochemistry. 1998. Butterworth Heineman, Oxford, U. K.

Borem, A.; Santos, F. R. and Bowen, D. E. 2003. Understanding biotechnology, Prentice Hall.

Boyer, R. 1999. Concepts in Biochemistry Brooks/Cole Publishing Company.

Burton, G. R. W.; Engelkirk, P. G. 2000. Microbiology for the Health Sciences. Lippincot Williams, and Wilkins, Philadelphia, U.S.A.

Cappuccino, J. C.; Sherman, N. 2001. Microbiology, Benjamin Cummings, San Francisco, U.S.A.

Carroll, S. B.; Grenier, J. K. and Weatherbee, S. D. 2005. From DNA to diversity-molecular genetics and the evolution of animal design. Blackwell Publishing.

Champe, P. C.; Harvey, R. A. 2000. Biochemistry. Lippincott-Raven Publishers, U.S.A.

Collado-Vides, J. and Hofestadt, R. 2002. Gene regulation and metabolism. The Bradford Book-The MIT Press.

Concepts Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A.

Copper, H. D.; Spillane, C.; Hodgkin, T. 2001. Broadening the Genetie Base of Crop Ppduction. GABI Publishing, U.K.

Cowell, J. K. 2001. Molecular Genetics of Cancer. Bios Scientific Publishers, U.K.

Davies, D. S. 2001. Genetic Dilemmas. Routledge, New York, U.S.A.

Davis, D. S. 2001. Genetic Dilemmas. Routledge, Taylor & Francis Group.

Dennis, C.; Gallagher, R. 2001. The Human Genome, Nature Palgrave, U.S.A.

Dickinson, I. M. 2003. Molecular Plant Pathology. Taylor & Francis Group.

Dominiczak, A. F.; Connell, J. M.; Soubrier, F. 1999. Molecular Genetics of Hypertension, Bios Scientific Publisher, U. K.

Edwards, A. W. 2000. Foundations of Mathematical Genetics Cambridge University Press, U. K.

Elliott, W. H.; Elliott, D. C. 2001. Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, Oxford, U.K.

Enger, E. D.; Ross, F. C. 2000. Concepts in Biology, McGraw-Hill, U.S.A.

Evett, L. W.; Weir, B. S. 1998. Interpreting DNA Evidence, Sinauer Associates, Inc/ Publishers, Sunderland Massachusetts, U.S.A.

Gjerde, D. T.; Hanna, C. P. and Hornby, D. 2002. DNA Chromatography. Wiley-VCH.

Gladwin, M.; Trattler, B. 2000. Clinical Microbiology McGraw-Hill, U.S.A.

Glich, B. R. and Pasternak, J. J. 2005. Molecular Biotechnology-Principles and applications of recombinant DNA. ASM Press.

Goldberg, S. 1999. Clinical Biochemistry, McGraw-Hill, U.S.A.

Gould, J. L.; Keeton, W. T. 1996. Biological Science, W. W. Norton & Company, New York, U.S.A.

Graham, G. 2002. Gene-A Philosophical Inquiry. Routledge, Taylor & Francis Group.

Graur, D.; Li, W. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Griffiths, A. F.; Miller, J. H.; Gelbart, W. M. 2000. An Introduction to Genetic Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.

Hamelton, D. 1996. Narrow Roads of Gene Land, W. H. Freeman, U.S.A.

Hammond, S. M.; Lambert, P. A. 1978. Antibiotics and Antımicrobial Action. Wdward Arnold, London, U.K.

Harold, F. M. 2001. The Way the Cell. Oxford University Press, U.K.

Hendrick, P. W. 2000. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A.

Heritage, J.; Evans, E. G.; Killington, R. A. 1996. Introductory Microbiology, Cambridge University Press, U.K.

Herren, R. V. 2005. Introduction to Biotechnology-An Agricultural Revolution. Thomson Delmar Learning.

Hey, J. 2001. Genes, Categories and Species. Oxford University Press, U.K.

Hey, J. 2001. Genes, Categories and Species. Oxford University Press.

Hope, I. A. 1999. Elegans. Oxford University, Press, U.K.

Horwitz, M. 2000. Basic Concepts in Medical Genetics. McGraw-Hill, U.S.A.

Isenberg, G. 1995. Cytoskeleton Proteins, Springer Verlag, Germany.

Jain, H. K. 1999. Genetics Concepts and Implications, Science Publisher, Inc., Enfield (U.S.A.).

Jamarin, J. 2001. Principles of Genetics, McGraw-Hill, New York, U.S.A.

Jordan, B. 2001. DNA Microarays: Gene Expression Applications. Springer Verlag, Germany.

Kereuzer, H.; Massey, A. Recombination DNA and Biotecnology, ASM Press, Washington, D. C., U.S.A.

Kieleczawa, J. 2005. DNA Sequencing-Optimizing the Process and Analysis. Jones and Bartlett Publishers.

Klug, W. S.; Cummings, M. R. 1996. Essentials of Genetics. Prentice-Hall, Inc. U.S.A.

Kontermann, R.; Dubel, S. 2001. Antibody Engineering. Springer Verlag, Berlin, Germany.

Kreuzer, H. and Massey, A. 2005. Biology and Biotechnology-Science, Applications and Issues. ASM Press.

Latchman, D. S. 2005. Gene Regulation. Taylor & Francis Group.

Lesk, A. M. 2001. Introduction to Protion architecture. Oxford University Press.

Lewin, R. 1997. Patterns in Evolution. Scientific American Library, New York, U.S.A.

Lewis, R. 1997. Human Genetics, WCB, Brown Publishers, U.S.A.

Lewis, R. 2001. Human Genetics, McGraw-Hill, New York, U.S.A.

Lewis, R. 2003. Hauman Genetics-Concepts and Applications. McGraw-Hill.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. 2000. Molecular Cell Biology, W. H. Freeman and Company, U.S.A.

Long, C. 1999. Genetic Testing and use of Information. The AEI Press, Washington. D. C., U.S.A.

Lowrie P.; Wells, S. 2000. Microbiology and Biotech-nology, Cambridge University Press, U.K.

Macdonald, F.; Ford, C. H. J. and Gasson, A. G. 2004. Molecular Biology of Cancer. Taylor & Francis Group.

Malcolm, S.; Goodship, J. 2001. Genotype to Phenotype, Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, U.K.

Maloy, S. R.; Cronan, J. E. Freifelder, D. 1994. Microbial Genetics, Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A.

McConkey, E. H. 2004. How the Human Genome works. Jones and Bartlett Publishers.

McGleenan, T.; Wiessing, U.; Ewald, F. 1991. Genetics and Insurance. BIOS Scientific Publisher Limited, U.K.

Mckane, L.; Kandel, J. 2001. Microbiology, Essentials and Applications. McGraw-Hill, U.S.A.

Melkin, D.; Lindee, M. 1995. The DNA Mystique. W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.

Midgley, G.; Clayton, Y. M.; Hay, R. J. 1997. Diagnosis in Colar Medical Mycology, Mosby-Wolfe, Chicago, U.S.A.

Morello, J. A.; Mizer, H. E.; Wilson, M. F. 1998. Microbiology, McGraw-Hill, U.S.A.

Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. 2000. Harper's Biochemistry, McGraw-Hill, U.S.A.

Nicholl, D. T. 1996. An Introduction to Genetic Engineering, Cambridge Univ. Press, U.K.

Nuber, U. A. 2005. DNA Microarrays. Taylor & Francis Group.

Onions, A. H. S.; Smith, D. 1983. Preservation and Maintenance of Living Fungi, C.A.B, Slough, England.

Parker, S. P. 1986. McGraw-Hill Dictionary of Biology, McGraw-Hill, U.S.A.

Passarge, E. 2001. Color Atlas of Genetics. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.

Patrick, G. L. 2001. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford, U.K.

Plomin, R.; DeFries, J. C.; McClearn, G. E.; Rutter, M. 1997. Behavioral Genetics. W.H. Freeman, New York, U.S.A.

Poole, R. K. 1998. Advances in Microbial Physiology, Academic Press, San Diego, U.S.A.

Rabilloud, T. 2000. Proteome Research-Two Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer Verlag, Germany.

Ratledge, C.; Kristiansen, B. 2001. Basic Biotechnology, Cambridge Univ. Press. U.K.

Raven, P. H.; Johnson, G. B. 2002. Biology, McGraw-Hill, New York, U.S.A.

Razdan. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Science Publishers, Inc.

Ring, C. A.; Blair, E. D. 2001. Genetically Engineered Viruses BIOS Scientific Publisher Limited, U.K.

Roshoski, R. 1996. Biochemistry, W. B. Saunders Company Philadelphia, U.S.A.

Russo, E.; Cove, D. 1995. Genetic Engineering, W. H. Freeman, U.S.A.

Saccone, C. and Pesole, G. 2003. Handbook of Comparative Genomics-Principles and Methodology. John Wiley.

Sapienza, A. M. and Stork, D. 2001. Leading Biotechnology Alliances. Wiley-Liss.

Sermonti, G. 1969. Genetics of Antibiotic Producing Microorganisms, Wiley-Interscience, U.S.A.

Shanson, D. C. 1999. Microbiology in Clinical Practice. Butterworth Heinemann, Oxford, U.K.

Sleifh, J. D.; Timbury, M. C. 1998. Notes on Medical Bacteriology, Churchill Livingstone, New York, U.S.A.

Snustad, D. P.; Simmons, M. J. 2000. Principles of Genetics. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A.

Spencer, C. A. 2006. Genes, Aging and Immortality. Pearson-Prentice Hall.

Stearns, S. C.; Hoekstra, R. F. 2002. Evolution an Introduction. Oxford University Press, Oxford, U.K.

Stokes, E. J.; Ridgway, G. L.; Wren, M. W. 1993. Clinical Microbiology. Edward Arnold, London, U.K.

Sussman, M. 1960. Growth and Development. Prentice-Hall, Inc., New Jersy, U.S.A.

Sutton, J. 1998. Biology, McMillan Press, U.K.

Swanson, C. R. 1960. The Cell. Prentice-Hall, Inc., New Jersy. U.S.A.

Talaro, K. P.; Talaro, A. 2002. Foundations in Microbiology, McGraw-Hill, U.S.A.

Teebi, A; Farag, T. 1997. Genetic Disorders Among Arab Populations, Oxford Univ. Press, U.K.

Thieman, W. J. and Palladino, M. A. 2004. Introduction to biotechnology. Pearson Benjamin Cummings.

Thomson, A. J. and Mc Whir, J. 2004. Gene Targeting and Embryonic stem Cell. Taylor & Franics Group.

Ting, I. P. 1982. Plant Physiology. Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, U.S.A.

Tourte, Y. 2004. Genetic Engineering and Biotechnology-Concepts, Methods and Agronomic Applications. Science Publishers, Inc.

Twyman, R. M. 2004. Gene Transfer to animal Cells. Taylor & Francis Group.

Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C. V. 1999. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A.

Watson, J D. 2000. A Passion for DNA, Oxford University Press, U.K.

Watson, J. D. 2001. Genes Girls and Gamow, Oxford University Press, U.K.

Weaver, R. F.; Hendrick, P. V. 2000. Basic Genetics. WCB-Brown Publisher.

Whitford, D. 2005. Proteins Structure and Function. John Wiley.

Wilkins, M. B. 1989. Adbanced Plant Physiology, Longman, Essex, U.K.

Wilson, G. N. 2000. Clinical Genetics, John Wiley and Sons, Inc., New York, U.S.A.

Wilson, K.; Walker, J. 2000. Practical Biochemistry: Princuples and Techniques. Cambridge University Press, U.K.

Young, A. G.; Clarke, G. M. 2000. Genetics, Demography and Viability of Fragmerted Population, Cambridge University Press, U.K.

Zubay, G. L. Biochemistry. 1998. WCB-Wm. C. Brown Publishers.

Zubay, G. L.; Parson, W. W.; Vance, D. E. 1995. Principles of Biochemistry, Wm. C. Brown Publishers, U.S.A.

Zweiger, G. 2001 Transducing the Genome. McGraw-Hill, U.S.A.

كتب الدار العربية للنشر والتوزيع

*** العلوم الطبية**

الديدان الشريطية	د. زورق السنوسى
الكيمياء الحيوية جـ١ ، جـ٢ ، جـ٣	ستراير
أطلس الأنسجة الطبيعية (بالألوان - حجم كبير)	د. محمد الرخاوى
مبادئ طب الفم والأسنان	د. عبدالله الرابطى
فن وعلم العلاج التحفظى للأسنان ٣ج (حجم كبير)	ستردفانت
الدراسة العلمية للبكتريا والفطريات الطبية (حجم كبير)	د. زورق السنوسى
الإيدز	ميشل اسكندر
عالم بدون ايدز	ل. شيتو
طب المجتمع	د. زهير السباعى
معايير الصحة البيئية الموجات فوق الصوتية	د. محمد عبدالمرضى
التحاليل المعملية وتفسيراتها	د. سمير زعقوق
الصحة النفسية	د. أديب الخالدى
أساسيات وممارسة الطب الباطنى ج١	تعريب. محمد خضر
أساسيات وممارسة الطب الباطنى ج٢	تعريب. محمد خضر
أساسيات وممارسة الطب الباطنى ج٣	تعريب. محمد خضر
أساسيات وممارسة الطب الباطنى ج٤	تعريب. محمد خضر
أساسيات وممارسة الطب الباطنى ج٥	تعريب. محمد خضر
أطلس الرأس والعنق	د. الرخاوى
أطلس الصدر والبطن	د. الرخاوى
علم التشريح (حجم كبير) علم وظائف الأعضاء الغدد الصماء	د. عبدالله عبدالرحمن
وظائف الأعضاء العملى	عبدالله عبدالرحمن

*** الوراثة**

مبادئ علم الوراثة ط٣	إلدون جاردنر
التدريبات الوراثية المعملية ط٢ (حجم كبير)	إلدون جاردنر
بيولوجيا ووراثة الخلية ط٢	د. فتحى عبدالتواب
علم الوراثة ط٢	د. محمد على الحاجى

للدار إصدارات أخرى فى مجالات علوم التربة والأرضى والحشرات والميكروبيولوجى والوراثة وعلوم تكنولوجيا الأغذية والعلوم الهندسية والبيئية والعلوم البحتة وغيرها.

كتب الدار العربية للنشر والتوزيع

*** علوم الأغذية والتغذية**

- أساسيات حفظ وتصنيع الأغذية	د. صبحى سالم
- أساسيات كيمياء الأغذية	جون دى مان
- أسس علوم الأغذية ط٢	جون نيكرسون
- أسس وتكنولوجيا الصناعات الزراعية والألبان	د. مصطفى كمال
- أنت والرجيم الغذائى	د. محمد كمال
- الأسرار الكامنة فى العسل واللقاح والبروبوليس	د. محمد عبدالمرضى
- الأسس العلمية لتغذية الرياضيين وغير الرياضيين	د. عائشة عبد المولى
- الأطعمة ودورها فى التغذية والجداول الغذائية	د. محمد كمال
- الاتجاهات الحديثة فى تصنيع وتداول الأغذية المجمدة	د. يوسف الشريك
- التغذية الصحية للإنسان	موترام
- الرضاعة الطبيعية	رقية حسنى
- الرضاعة والفطام فى الطب والقرآن	د. محمد كمال
- الزيوت الطيارة	د. الشحات نصر
- الطريق إلى الغذاء الصحى	د. مصطفى عبدالرازق
- الغذاء بين المرض وتلوث البيئة	د. أحمد عسكر
- الغذاء والأعشاب وصحة الإنسان	د. سمير عطية
- المرجع العلمى فى تغذية الإنسان	د. سناء محمد
- المعاملات الحرارية فى مصانع الألبان	د. عبد الله جعفر
- المواد الحافظة للأغذية ط٢	إيرش لوك
- الموسوعة المصرية لتغذية الإنسان ج١	د. محمد كمال
- تكنولوجيا اللحوم (الجودة - الحفظ - التداول)	د. يوسف الشريك
- تكنولوجيا صناعة السكر ومنتجات الكاكاو والحلوى	د. فريال عبد العزيز
- تنمية المهارات العلمية فى مجال الصناعات الغذائية	د. مصطفى كمال
- حفظ وتصنيع منتجات الخضر والفاكهة	د. أحمد عليان
- علم التغذية العامة (أساسيات فى التغذية المقارنة)	د. حامد التكرورى
- كيمياء الأغذية	د. عادل جورج

للدار إصدارات أخرى فى مجالات علوم التربة والأرضى والحشرات والميكروبيولــوجى والوراثة وعلوم تكنولوجيا الأغذية والعلوم الهندسية والبيئية والعلوم البحتة وغيرها.

كتب الدار العربية للنشر والتوزيع

*** العلوم البيئية**

- منظفات البيئة — د. أحمد عبدالوهاب
- المنهج الإسلامى فى علاج تلوث البيئة ط٢ — د. أحمد عبدالوهاب
- كيف تحمى أسرتك من الإصابة بالفشل الكلوى ط٢ — د. أحمد عبدالوهاب
- تلوث الهواء — د. أحمد عبدالوهاب
- تلوث التربة الزراعية — د. أحمد عبدالوهاب
- القمامة — د. أحمد عبدالوهاب
- التربية البيئية — د. أحمد عبدالوهاب
- التشريعات البيئية — د. أحمد عبدالوهاب
- النفايات الخطرة — د. أحمد عبدالوهاب
- تلوث المياه العذبة — د. أحمد عبدالوهاب
- تلوث المواد الغذائية — د. أحمد عبدالوهاب
- تلوث البيئة الزراعية — د. أحمد عبدالوهاب
- الربيع الصامت — د. أحمد عبدالوهاب
- البحر المتوسط — د. أحمد عبدالوهاب
- موسوعة البيئة للوطن العربي (حتمية التحول إلى الزراعات) — د. أحمد عبدالوهاب
- موسوعة البيئة للوطن العربى (أسس تدوير النفايات) — د. أحمد عبدالوهاب
- موسوعة البيئة للوطن العربى (تكنولوجيا تدوير النفايات) — د. أحمد عبدالوهاب
- موسوعة البيئة للوطن العربى (قضايا النفايات) — د. أحمد عبدالوهاب
- موسوعة البيئة للوطن العربى (أغرب المجتمعات) — د. أحمد عبدالوهاب
- موسوعة البيئة للوطن العربى (التكافل الاجتماعى البيلى) — د. أحمد عبدالوهاب
- المياه العذبة (مصادرها وجودتها) — د. سمير المنهراوى
- مستقبل المياه فى الوطن العربى — د. مغاورى شحاته
- الملوثات الكيميائية والبيئية — د. زيدان هندى
- التسمم الغذائى والملوثات الكيميائية — د. زيدان هندى
- السمية البيئية والتفاعلات الحيوية للكيميائيات والمبيدات — د. زيدان هندى
- الحماية القانونية لبيئة المياه العذبة — د. سحر حافظ
- دليل الدراسات البيئية — د. سمير المنهراوى

للدار إصدارات أخرى فى مجالات علوم التربة والأرضى والحشرات والميكروبيولوجى والوراثة وعلوم تكنولوجيا الأغذية والعلوم الهندسية والبينية والعلوم البحتة وغيرها.

